

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 951 287**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2018 PCT/US2018/031542**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2018 WO18208743**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2018 E 18734651 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2023 EP 3621989**

54 Título: **Método para controlar la formación del color rosa durante la fabricación de anticuerpos**

30 Prioridad:

09.05.2017 US 201762503615 P

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

19.10.2023

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**DU, CHENG;
BORWANKAR, AMEYA UMESH;
YEE, JOON CHONG y
TAN, ZHIJUN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 951 287 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para controlar la formación del color rosa durante la fabricación de anticuerpos

5 Antecedentes

Las terapéuticas con anticuerpos monoclonales (mAb) se vuelven más populares en el tratamiento de múltiples enfermedades humanas. Como macromoléculas, los mAb tienen cierta heterogeneidad debido a una amplia gama de modificaciones postraduccionales. El control exitoso del proceso de fabricación es fundamental para garantizar la calidad y la seguridad del producto y la consistencia de lote a lote de las proteínas terapéuticas. De hecho, la directriz ICH Q6B requiere una especificación de apariencia del producto.

La fabricación normal de anticuerpos suele tener alguna variación de color que es aceptable (Derfus GE, et.al., *MAbs* (2014) 6(3):679-688, Prentice K.M., et al., *MAbs* (2013) 5(6):974-981, Vijayasankaran N., et.al., *Biotechnol Prog* 2013, 29(5):1270-1277, Xu J., et al., *Process Biochemistry* 2014, 49:130-1394). Sin embargo, la variación de color debido a las impurezas en el proceso es un asunto de la falta de control del proceso. Una de las principales fuentes de color rosa/rojo en el fármaco final ha sido identificada como el complejo vitamina B₁₂-mAb (Derfus, 2014, Prentice, 2013). Aunque la naturaleza de la interacción no ha sido dilucidada, la unión de la vitamina B₁₂ a la proteína parece lo suficientemente fuerte como para coeluirse a través de múltiples etapas de purificación posteriores, incluyendo la cromatografía de afinidad con proteína A, la inactivación viral a pH bajo, varias cromatografías de pulido y ultrafiltración y diafiltración.

Los anticuerpos se producen comúnmente en células de mamíferos, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), y se secretan extracelularmente en los medios de cultivo celular. Al final del proceso de cultivo, las células se separan de los medios de cultivo durante la etapa de recuperación primaria utilizando métodos tales como centrifugación, filtración profunda o floculación para clarificar el fluido de recolección. Durante este proceso, las células a menudo sufren diversas tensiones, incluyendo corte mecánico, exposición a un entorno con poco oxígeno disuelto (OD), o cambios de temperatura y pH. Estas tensiones provocan daños celulares que dan como resultado la liberación de componentes intracelulares no deseados en el fluido clarificado. Estos componentes citosólicos, tales como lípidos y enzimas, pueden afectar potencialmente a la calidad del producto y cuidadosamente se debe hacer un seguimiento de los mismos o eliminarlos. Por ejemplo, la liberación de agentes reductores intracelulares puede conducir a la reducción de los enlaces disulfuro de los anticuerpos (Mun M., et.al. *Biotechnol Bioeng* 2015; 112:734-742; Ruau del J., et al. *BMC Proceedings* 2015;9 (Suplemento 9):P24; Mullan B., et al. *BMC Proc.* 2011;5(Suplemento 8):P110; Trexler-Schmidt M., et al. *Biotechnol Bioeng.* 2010;106:452-461; Koterba, K.L., et al. *J. Biotechnol.* 2012;157:261-267; Handlogten M.W., et al. *Biotechnol Bioeng.* 2017;114:1469-1477; Hutchinson N., et al. *Biotechnol Bioeng.* 2006;95:483-491).

Durante el proceso de fabricación, se ha observado una gran reducción de anticuerpos después de la operación de recolección y/o la cromatografía de Proteína A. Múltiples parámetros de proceso pueden tener un impacto en el grado de reducción de anticuerpos. Por ejemplo, mantener altos niveles de oxígeno disuelto (OD) durante la recolección es vital para mantener intactas las moléculas de anticuerpo (Mun M. 2015; Trexler-Schmidt M., 2010). Las fuerzas cortantes mecánicas, que hacen que la lisis celular y los componentes celulares se filtren en los fluidos de recolección, también contribuye significativamente a la reducción (Kao YH, et.al. *Biotechnol Bioeng.* 2010; 107:622-632; Hutterer K.M., et al. *MAbs.* 2013;5:608-613). Otros parámetros del proceso, tales como el tiempo de retención de la recolección (Chung WK, et.al. *Biotechnol Bioeng.* 2017;114:1264-12741), componentes del medio (tales como iones de cobre, cisteína/cisteína) y pH y temperatura, (Trexler-Schmidt M., 2010; Chung, 2017) también tienen un efecto sobre el grado de reducción de disulfuro.

Para garantizar la calidad del producto anticuerpo, los controles en el proceso de fabricación son necesarios para controlar las especies de bajo peso molecular (BPM) formadas a partir de la reducción de los enlaces disulfuro de anticuerpos. Como resultado, se han propuesto varias estrategias en los últimos años para controlar la reducción de disulfuro. Se han probado inhibidores químicos para impedir la reducción de anticuerpos, incluido el tratamiento previo y posterior a la recolección con agentes antirreductores, tales como el sulfato cúprico (Chaderjian W.B., et.al. *Biotechnol Prog.* 2005;21:550-553), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), inhibidores de tioredoxina, (Patente de EE. UU. No. 8.574.869) cisteína, azul de metilo (WO 2015/085003) y análogos de coenzima Q (Li WW, et.al. *J. Am. Chem. Soc.* 2005;127:6140-614). Aunque el conocimiento y los métodos relacionados con las estrategias de mitigación han aumentado con los años, la implementación de estos métodos en la producción no está exenta de dificultades, tales como la introducción de subproductos químicos que deben eliminarse mediante etapas de cromatografía, mayor tiempo de procesamiento y el riesgo de modificaciones distintas a las deseadas o daño al producto anticuerpo.

Luo et al. *J. Pharm. Sci.* 2005;94(2):304-316 estudia la cinética de reacción de la cisteína con peróxido de hidrógeno en tampones acuosos (en ausencia de iones metálicos) en un amplio intervalo de pH para comprender el mecanismo de la reacción tiol-H₂O₂.

El documento WO02015085003 enseña un método para minimizar la reducción de enlaces disulfuro en la producción de anticuerpos mediante la adición de un agente antirreductor también en el líquido de recolección; el agente

antirreductor es azul de metileno, quinona o un disulfuro.

Sumario de la invención

- 5 Los inventores descubrieron que la generación del color rosa durante la fabricación de anticuerpos requiere grupos sulfhidrilo libres en anticuerpos reducidos e hidroxocobalamina, la forma activa de la vitamina B12.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención es un método para impedir la reducción de los enlaces disulfuro de los anticuerpos que comprende añadir peróxido de hidrógeno al volumen clarificado en el momento de la recolección. La invención también abarca el uso de peróxido de hidrógeno en la recolección para inhibir la formación del color rosa durante la fabricación de anticuerpos.

En un segundo aspecto, la invención es un método para inhibir la unión de la vitamina B12 a los anticuerpos durante la fabricación de los cultivos celulares; este método comprende (a) impedir la reducción de los enlaces disulfuro de los anticuerpos agregando peróxido de hidrógeno al volumen clarificado en el momento de la recolección; e (b) inhibir la conversión de CN-Cbl a HO-Cbl evitando la exposición del medio a la luz visible durante uno o más tiempos seleccionados de la preparación del medio, almacenamiento del medio, producción de anticuerpos y recolección de anticuerpos.

En una realización, CN-Cbl se expone únicamente a la luz roja (>600 nm) durante la preparación del medio, el almacenamiento del medio y, opcionalmente, durante la producción de anticuerpos y la recolección de anticuerpos.

En un aspecto adicional, la invención es un proceso de cultivo celular para la producción de anticuerpos que comprende 1) cultivar células que producen el anticuerpo de interés, 2) recolectar el anticuerpo de interés del cultivo celular y 3) añadir peróxido de hidrógeno al volumen clarificado en la recolección. En una realización, el proceso comprende además preparar y almacenar los medios de cultivo celular en condiciones de luz roja (>600 nm). En una realización adicional, el proceso comprende además cultivar células que producen el anticuerpo de interés y recoger el anticuerpo de interés del cultivo celular en condiciones de luz roja (>600 nm).

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1D muestran la absorción espectral de la vitamina B₁₂ y dos lotes de mAb B. 1A es un espectro de absorción de la vitamina B₁₂ y dos lotes de mAb B. Vitamina B₁₂ (cianocobalamina) a 5 mg/l en PBS (línea azul), un lote de color rosa (línea roja) y un lote incoloro (línea morada) de 250 a 800 nm. 1B es un gráfico reescalado de (1A) para mostrar detalles. 1D es una botella de eluido de proteína A para mAb B que tiene un color rosa visible.

Las Figuras 2A - 2D muestran que la unión de la vitamina B₁₂ al anticuerpo es una reacción de segundo orden. (2A) Dos lotes incoloros de mAb A, el lote sin moléculas de anticuerpo reducidas detectadas (el lote "bueno") y el otro con la mayoría de los anticuerpos reducidos (el lote "malo") se mezclaron con CN-Cbl o HO-Cbl. Después de la incubación, se eliminó el exceso de vitamina B12 libre. Muestras de izquierda a derecha, el lote bueno y CN-Cbl; el lote malo y CN-Cbl; el lote bueno y HO-Cbl; el lote malo y HO-Cbl; y el lote malo se trató primero con peróxido de hidrógeno, a continuación, se mezcló con HO-Cbl. (2B) El peróxido de hidrógeno puede oxidar el anticuerpo reducido para reformar el monómero del anticuerpo como se muestra por CE SDS. (2C) Cuantificación de monómero de mAb y diferentes especies de bajo peso molecular en mAb tratado y no tratado con peróxido de hidrógeno mostrado en 2B. (2D) Análisis CE-SDS no reducido del material de mAb A Lote 2 antes (línea azul) y después (línea negra) de la unión de la vitamina B₁₂. Los patrones de picos individuales cambiaron antes y después de la incubación con vitamina B₁₂ muy probablemente debido a la oxidación de los grupos sulfhidrilo libres y la reformación de los enlaces disulfuro en el aire.

Las Figuras 3A - 3C muestran los datos del espectro de masas para la identificación de la conjugación de la vitamina B₁₂. (3A) Espectros MS/MS de *m/z* = 664,79 de HO-Cbl y *m/z* = 678,29 de CN-Cbl. (3B) Espectros MS/MS de complejos péptido-cobalamina L19-cobalamina y L18-19-cobalamina. (3C) Ilustración de enlaces disulfuro de anticuerpos IgG4. Los residuos de cisteína que se unen a la vitamina B₁₂ están marcados en azul y los pares de residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro están encerrados en un círculo rojo.

Las Figuras 4A -4E muestran los espectros de transmitancia de luz de los filtros de color usados en el Ejemplo 1 (4A). Cromatogramas para la separación en RP-UPLC y detección a 360 nm de (4B) CN-Cbl y HO-Cbl en estándares; (4C) medios de cultivo frescos para mAb A; (4D) medios expuestos a luz de color rojo; y (4E) medios expuestos a luz de color verde. En (4D y 4E), las líneas negras, azules y rojas representan energías de exposición de 0,3, 0,6 y 1,2 millones de luxes h, respectivamente.

La Figura 5A-5C muestra el nivel de sulfhidrilo libre y el bajo peso molecular (BPM) en CB. (5A) Correlación de los niveles de tiol libre de las muestras de CB con mAb 1 y la presencia de BPM en las correspondientes muestras purificadas de Proteína A (PAVIB). Las PAVIB se analizaron por NR_Calibrador para especies de BPM. Aquellas muestras con BPM ≥ 5 % se etiquetan como "Sí", lo contrario como "No". El análisis se realizó con el programa informático JMP. (5B) Medición de los niveles de tiol libre en CB bajo diferentes tratamientos de recolección. El

volumen de recolección clarificado (CB) de un biorreactor a escala de laboratorio (5-L), que contenía mAb 1 se trató reduciendo el pH a 4,8 en ausencia o presencia de sulfato de dextrano. Las muestras de CB se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente antes de que la muestra se filtrara en profundidad. Después de la filtración en profundidad, se incubó una alícuota de cada muestra a 37 °C durante 75 minutos con o sin adición de NADPH 1 mM antes de medir el contenido de sulfhidrilo libre. También se incluyeron a modo de comparación un lote de fabricación con un alto porcentaje de BPM y un lote representativo (lote normal). (5C) El porcentaje de anticuerpo intacto para las muestras en (5B). El anticuerpo intacto se midió mediante NR_Calibrador después de la purificación de la Proteína A.

Las Figuras 6A-6F muestran el tratamiento del indicador redox DCPIP y la observación del cambio de color como marcador de pronóstico para la generación de BPM. (6A) Estructura y reacción de DCPIP. (6B) Las muestras de DS purificadas mAb2 de la izquierda con > 95 % de BPM (3,1 grupos sulfhidrilo por proteína de anticuerpo), se mostraron incoloras cuando se trataron con DCPIP. Las muestras de mAb2 de la derecha con más del 98 % de anticuerpos intactos (0,4 sulfhidrilo por proteína de anticuerpo) mostraron un color púrpura (en pH 5,5) en presencia de DCPIP. (6C) Cambio de color de DCPIP en CB de mAb 2 de diferentes condiciones de cultivo. El DCPIP en los dos tubos de la izquierda se volvió completamente incoloro, indicando que hubo mayor potencial reductor en el CB; el DCPIP en los dos tubos del medio tenía color azul, indicando eventos no reductores; y el DCPIP en el tubo derecho se llegó a reducir parcialmente. (6D) Concentraciones de tiol libre en función del porcentaje de mAb 2 de lisis celular. El lisado celular al 100 % de mAb 2 se mezcló con CB regular para generar una curva de dilución de lisados celulares y las concentraciones de tiol libre se midieron y se informaron como el promedio de muestras duplicadas. La ecuación de regresión lineal y R cuadrado se calcularon con Excel. (6E) Diseño de estudio para ensayar el orden de cambio de color de DCPIP y la cantidad de tiol libre. (6F) Imagen de los resultados del ensayo con DCPIP del estudio en la **Tabla 7**. Las muestras del panel superior recibieron aire antes y durante la recuperación primaria. Las muestras en el fondo tenían gas nitrógeno antes y durante la recuperación primaria. El orden de los tubos de ensayo de izquierda a derecha era el mismo que en la **Tabla 7** desde la parte superior al fondo.

Las Figuras 7A-7K muestran el uso de peróxido de hidrógeno para evitar la reducción de enlaces disulfuro. El CB generado a escala de laboratorio de mAb 2 se dividió en alícuotas en recipientes con varias concentraciones de peróxido de hidrógeno. La condición sin aire dentro de los contenedores se generó mediante lavado con nitrógeno y se mantuvo a temperatura ambiente durante un día. Las muestras resultantes se analizaron directamente por Calibrador no reducido (7A, 7C, 7E, 7G, 7I) y reducido (7B, 7D, 7F, 7H, 7J) sin purificación de Proteína A. (7A y 7B) El CB sin adición de peróxido de hidrógeno se expuso al aire como control. Se mantuvo CB con 0 mM (7C y 7D), 0,33 mM (7E y 7F), 1 mM (7G y 7H) y 3 mM (7I y 7J) de peróxido de hidrógeno en condiciones sin aire. (7K) Sumario de los resultados del calibrador no reducido de la fragmentación de mAb. Puesto que había un exceso de cadena ligera de este mAb secretado por las células hospedadoras. La cantidad de cadena ligera no se incluyó como fragmento. Abreviaturas usadas para las especies de BPM: LC, cadena ligera; HC, cadena pesada; HL, medio anticuerpo con una cadena ligera y una cadena pesada; HHL, anticuerpo parcial con una cadena ligera y dos cadenas pesadas.

Las Figuras 8A-8F muestran la evaluación del uso de peróxido de hidrógeno para evitar la reducción de enlaces disulfuro en el peor de los casos. El CB de mAb 2 ensayado tuvo el 100 % de lisis celular como se describe en el Ejemplo 2. Las condiciones de mantenimiento con o sin aire fueron las mismas que en la Figura 7. (8A) Muestra de CB sin tratamiento con peróxido de hidrógeno y mantenida con aire sirve como control. (8B) Muestra de CB sin tratamiento con peróxido de hidrógeno y mantenida en condiciones sin aire. (8C) Se añadió peróxido de hidrógeno 5 mM a la muestra de CB antes de mantenerla en condiciones sin aire. (8C) Se añadió peróxido de hidrógeno 10 mM a la muestra de CB antes de mantenerla en condiciones sin aire. Las muestras de CB resultantes (8A a 8D) se analizaron directamente mediante calibrador no reducido sin purificación de Proteína A. (8E) Sumario de los resultados del calibrador no reducido de la fragmentación de mAb de CB sin purificar. (8F) Sumario de las purezas de los anticuerpos intactos de las muestras 8A a 8D usando cromatografía de Proteína A purificada y analizadas por calibrador no reducido.

Las Figuras 9A-9D muestran el uso de peróxidos alternativos para evitar la reducción de enlaces disulfuro de anticuerpos. Se usaron percarbonato de sodio y perborato de sodio en el peor de los casos de 2 CB de mAb con el 100 % de lisis celular. (9A) Muestra de CB mantenida con aire y sin peróxidos. (9B) Muestra de CB mantenida en condiciones sin aire y sin peróxidos. (9C) Un resultado representativo de una muestra de CB tratada con percarbonato de sodio 5 mM. El percarbonato de sodio se agregó antes de mantenerla en condiciones sin aire. Los resultados provinieron de calibrador no reducido en CB sin purificar (9A a 9C). (9D) Sumario del tratamiento con percarbonato de sodio y perborato de sodio. Los resultados provinieron de calibrador no reducido en CB sin purificar.

Descripción detallada

La invención se define en las reivindicaciones y está respaldada por las siguientes enseñanzas técnicas.

El control del proceso de fabricación de productos biológicos es fundamental para garantizar la calidad y la seguridad

del producto y la consistencia de lote a lote de las proteínas terapéuticas. La comprensión del mecanismo de generación de color durante la fabricación es fundamental para desarrollar una estrategia de control. Los inventores descubrieron que la generación del color rosa durante la fabricación de anticuerpos es una reacción de segundo orden que depende de las concentraciones de tanto los grupos sulfhidrilo libres en anticuerpos reducidos como de hidroxocobalamina, la forma activa de la vitamina B₁₂. Ambos reactivos son necesarios y ninguno de ellos por sí solo es suficiente para generar el color rosa.

Los inventores descubrieron que la forma activa de la vitamina B₁₂ se une al grupo sulfhidrilo libre de la cisteína ubicado en la cadena pesada 134 (HC134), la cadena ligera 214 (LC214), la cadena pesada 321 (HC321), la cadena pesada 367 (HC367) y la cadena pesada 425 (HC425). Los cinco residuos de cisteína se distribuyen entre las regiones Fab y Fc. Hay dos pares de enlaces disulfuro entre estos cinco residuos de cisteína, LC214 con HC134 y HC367 con HC425 (**Figura 3c**). Cuando estos enlaces disulfuro particulares se reducen durante la fabricación y la recolección, ambos residuos de cisteína en el par disulfuro tienen la misma accesibilidad para la unión de hidroxocobalamina.

Como se usa en el presente documento, "cianocobalamina" y "CN-Cbl" se usan indistintamente y se refieren al componente vitamina B₁₂ (VB12) del medio de cultivo celular. Igualmente, "hidroxocobalamina" y "HO-Cbl" se usan indistintamente y se refieren a la forma activa de la vitamina B₁₂ (VB 12) en el medio de cultivo celular disponible para unirse a los anticuerpos reducidos durante la fabricación y la recolección.

Los anticuerpos se producen comúnmente en células de mamíferos, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), y se secretan extracelularmente en los medios de cultivo celular. Al final del proceso de cultivo celular, las células se separan de los medios de cultivo durante la etapa de recuperación primaria utilizando métodos tales como centrifugación, filtración profunda o floculación para clarificar el fluido de recolección.

Como se usa en el presente documento, "volumen clarificado" y "CB" se usan indistintamente y se refieren a la solución recogida después de la etapa de recuperación primaria, tal como centrifugación, filtración profunda o floculación, que se usa para clarificar el fluido del cultivo celular.

Como se usa en el presente documento, "preparación del medio de cultivo celular" "almacenamiento del medio de cultivo celular", "proceso de cultivo celular" "fabricación de anticuerpos", "producción de anticuerpos" y "recolección de anticuerpos", "recolección", se refieren a las muchas etapas necesarias para producir anticuerpos. Cada etapa puede ocurrir en diferentes lugares dentro de una instalación de fabricación.

Uso de luz de color rojo en el entorno de fabricación como estrategia de control del color rosa.

Puesto que tanto la hidroxocobalamina como los anticuerpos reducidos son necesarios para la generación de productos de color rosa, el control de uno o ambos factores evitará la generación del color rosa.

La conversión de la vitamina B₁₂ inducida por la luz puede ocurrir durante la preparación del medio, almacenamiento del medio y procesamiento del cultivo celular. El uso de bolsas de bioprocesamiento desechables transparentes en la preparación de medios, la duración del almacenamiento y la duración del cultivo celular en biorreactores de vidrio aumentan el riesgo de la exposición a la luz y la conversión de la vitamina B₁₂. Estrategias generales de control, tales como el uso de recipientes apropiados (por ejemplo, recipientes de acero inoxidable), el recubrimiento con material de capa adicional, la evitación de la exposición innecesaria a la luz, pueden proporcionar protección frente a la luz. Sin embargo, la implementación de estas estrategias no está exenta de desafíos y, a menudo, incluye costos adicionales.

El Ejemplo 1 muestra que la luz roja no induce la conversión de CN-Cbl a HO-Cbl. Se añadió mAb A reducido a medios de cultivo que se habían expuesto a luz blanca, luz roja o luz verde, o se habían mantenido en la oscuridad. Tras la incubación nocturna, el mAb se purificó mediante una columna de proteína A y se midió la vitamina B₁₂ unida por ensayo ELISA. Como se muestra en la **Tabla 7**, el orden de los índices de conjugación de la vitamina B₁₂ fueron luz blanca > luz verde > luz roja y en control oscuro.

Por tanto, para inhibir o impedir la conversión de cianocobalamina a hidroxocobalamina, la luz blanca podría reemplazarse con luz de color rojo (longitudes de onda >600 nm) en las áreas donde se preparan y almacenan los medios de cultivo celular y, opcionalmente, en las áreas de fabricación y recolección de cultivos celulares.

Preferentemente, la luz blanca se reemplaza por luz de color rojo (longitudes de onda >600 nm) en las áreas donde se preparan y almacenan medios de cultivo celular y, opcionalmente, en las áreas de fabricación y recolección de cultivos celulares.

Con este fin, por ejemplo, las bombillas de luz blanca se pueden reemplazar por bombillas de luz LED de color rojo (longitudes de onda >600 nm) en dichas áreas.

Como otro ejemplo, se pueden colocar láminas de plástico de color rojo o alternativamente tubo de color rojo sobre las bombillas de luz blanca en dichas áreas.

Las luces blancas se pueden reemplazar por luz de color rojo de la manera mencionada anteriormente: en las áreas donde se prepara o almacena el medio de cultivo celular; y también en el área de fabricación del cultivo celular, en el área de recolección del cultivo celular, o en ambos.

5 Prevención de la reducción de anticuerpos durante la recolección de proteínas y la recuperación primaria como una estrategia de control del color rosa.

Puesto que tanto los anticuerpos reducidos como la hidroxocobalamina son necesarios para la generación de productos de color rosa, el control de uno o ambos factores evitará la generación del color rosa.

La reducción de los enlaces disulfuro durante la fabricación de mAb es una reacción redox enzimática y la causa principal de la formación de especies de bajo peso molecular (BPM) durante el proceso de fabricación de anticuerpos BPM. Aunque las causas de la generación de BPM no se comprenden bien, se cree que la aparición de BPM resulta de un efecto combinatorio de las condiciones de cultivo celular, tales como temperatura, oxígeno disuelto (OD), pH, viabilidad, densidad celular, porcentaje de lisis, etc., que crea un entorno reductor para el anticuerpo. Esto se ve agravado aún más por las condiciones de mantenimiento del volumen clarificado (CB) (por ejemplo, temperatura, duración, aireación), que retienen el anticuerpo en el entorno reductor. La detección de BPM generalmente se visualiza en el volumen clarificado o en las etapas de combinación de eluido de proteína A.

El Ejemplo 2 muestra que existe un riesgo bajo de generación de BPM si el nivel de tiol libre es inferior a 100 mM; un nivel de tiol libre de 100-200 mM es una señal de advertencia; y el nivel de tiol libre por encima de 200 mM es un alto riesgo de generación de BPM. Se han propuesto muchas estrategias de mitigación para impedir la reducción de anticuerpos para inhibir las enzimas involucradas en la reacción redox o para oxidar y agotar los cofactores enzimáticos críticos, tales como NADPH (Mun M 2015, Trexler-Schmidt M. 2010). Se ha demostrado que el rociado de aire es una forma sólida de impedir la reducción de anticuerpos. Sin embargo, el nivel de tiol libre total aún puede oscilar entre el nivel micromolar durante la fabricación y el nivel milimolar después de mantener el CB sin aire (Tabla 7). La Figura 8 muestra que, en el peor de los casos, en condiciones de volumen clarificado, la exposición al aire no pudo suprimir completamente la reducción de anticuerpos.

Los inventores descubrieron que la adición de peróxido al volumen clarificado durante la recolección evita la reducción del enlace disulfuro de anticuerpos y la generación de especies de BPM. Los beneficios de usar peróxido incluyen 1) el peróxido se puede mezclar con agua en cualquier proporción y 2) la eliminación del exceso de peróxido no debería ser una carga para la purificación posterior. Sin embargo, mientras que la descomposición completa de una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 10 mM en agua y oxígeno teóricamente puede generar oxígeno 5 mM, este proceso es lento en ausencia de catalizadores.

El ejemplo 2 muestra que la adición de peróxido de hidrógeno, o peróxidos inorgánicos u orgánicos alternativos tales como el percarbonato de sodio o el perborato de sodio, al volumen clarificado puede impedir eficazmente la reducción de enlaces disulfuros de anticuerpos.

Por tanto, de acuerdo con la invención, la reducción de enlaces disulfuro de los anticuerpos se evita agregando peróxido de hidrógeno al volumen clarificado en el momento de la recolección.

En un ejemplo, la reducción de enlaces disulfuros de anticuerpos se evita manteniendo la concentración de peróxido de hidrógeno del volumen clarificado en la recolección en ≤ 10 mM.

En otro ejemplo, la reducción de enlaces disulfuros de anticuerpos se evita manteniendo la concentración de peróxido de hidrógeno del volumen clarificado en la recolección entre 3 mM y 10 mM.

50 Ejemplos

Ejemplo 1

Asociación de vitamina B12 con mAbs

Soluciones madre de proteína

En este estudio se utilizaron dos moléculas IgG4 terapéuticas diferentes (**mAb A y B**). Ambas tienen una única mutación puntual de serina a prolina en el motivo de la región bisagra CPSC de la IgG4 original para parecerse a la estructura de enlace disulfuro intercatenarior de IgG1 (Liu H. et.al.: *MAbs* (2012) 4(1): 17-23; Aalberse R.C. et.al. *Immunology* 2002, 105(1):9-19). Los anticuerpos IgG4 se produjeron en células CHO y se purificaron por afinidad usando cromatografía de proteína A, cromatografía de pulido adicional y filtración UF/DF final a un tampón basado en histidina. La concentración de proteína del fármaco (DS) se determinó por absorción a 280 nm.

ELISA de vitamina B12.

Para la determinación de la cantidad de vitamina B₁₂ (VB12) asociada con la proteína purificada se utilizó un kit de medición comercial de VB12 (Monobind Inc., Lake Forest, CA) con los procedimientos recomendados por el fabricante.

Unión de la vitamina B₁₂ in vitro al fármaco.

- 5 La solución de **mAb A o mAb B** (50 mg/ml) en un tampón a base de histidina se mezcló con CN-Cbl (Sigma-Aldrich, V2876, solución madre 1 mg/ml en agua) o HO-Cbl (Sigma-Aldrich, V5323, solución madre 1 mg/ml en agua) en una relación molar de 4:1 a 2:1 (proteína:VB12). La reacción fue a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 día. El intercambio de tampón con tampón de solución salina de fosfato (PBS, Sigma-Aldrich, D5652) se logró a través de un
10 filtro centrífugo Amicon de corte de 50 kDa hasta que no hubo color visible en el flujo. La solución de reacción con intercambio de tampón se sometió a análisis de mapeo de péptidos.

Oxidación con peróxido de hidrógeno de anticuerpos reducidos.

- 15 En un lote de **mAb A** se redujo parcialmente los enlaces disulfuro durante la fabricación. El fármaco se mezcló con peróxido de hidrógeno al 0,1 % (30 mM) durante 4 horas a temperatura ambiente y el exceso de peróxido de hidrógeno se eliminó mediante intercambio de tampón como se ha mencionado anteriormente.

Estudios de exposición a la luz.

- 20 En el estudio de exposición a la luz se usó medio recién preparado para **mAb A**. Se añadió CN-Cbl hasta una concentración final de 10 mg/l (a partir de una solución madre de 1 mg/ml).

- 25 Se usó una bombilla de luz fluorescente compacta (CFL) de luz blanca de 13 W como fuente de luz visible. Se usó una bombilla de luz negra de 13 W disponible en el mercado centrada en 360 nm como fuente de luz UV. La lámpara se instaló en una campana de extracción con un caudal de aire de 200 pies cúbicos por minuto para evitar el calentamiento de las soluciones. La superficie de la mesa de trabajo estaba oscura para evitar el reflejo de la luz. Las muestras se colocaron a una distancia aproximada de 12 a 13 pulgadas de la lámpara (la intensidad promedio fue de 672 lux en la superficie de los tubos) para simular las condiciones normales de luz de la habitación (500 - 1.000 lux).
30 Las intensidades de luz se midieron con fotómetros (fotómetro de UVA/B Sper Scientific Modelo 850009 y Extech HD400 para UVA y luz visible, respectivamente). Los filtros de color se adquirieron de Arbor Scientific (Kit 33-0190). Los espectros de transmitancia de los filtros se muestran en la **Figura 4**. Se compró una lámina de plástico de policarbonato (2,4 mm de espesor) en una ferretería y se usó para filtrar la luz UVA.

- 35 Todas las muestras del medio se expusieron a la fuente de luz y se tomaron muestras a 0,3, 0,6 y 1,2 millones de lux h (intensidad x tiempo de exposición) para luz visible o 71 y 212 Watts por metro cuadrado para luz UVA.

Ensayo de grupo sulfhidrido libre.

- 40 El método utiliza el reactivo de Ellman, 3,3'-ditio-bis(ácido 6-nitrobenzoico), disulfuro de 3-carboxi-4-nitofenilo; ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoico (DTNB) con una ligera modificación de la bibliografía (Arner ES et.al. *Methods Enzymol* 1999, 300:226-239). Resumiendo, se mezclaron 10 µl de muestra de fármaco con 15 µl de tampón TE (50 mM Tris-HCl, EDTA 20 mM, pH 7,6) en una placa de 96 pocillos. Se mezcló recién una solución de DTNB (5 mg/ml en etanol, de Sigma-Aldrich, D8130) con guanidina-HCl 8 M en Tris 0,2 M (pH 8) en una relación de volumen de 1:9 antes de su uso. A continuación, se añadieron 100 µl de la solución de DTNB/guanidina a cada pocillo y se mezclaron. Se midió
45 la absorción espectral a 412 nm y se utilizó el valor del coeficiente de extinción molar de 13.600 M⁻¹ cm⁻¹ para el cálculo.

Pruebas de desnaturalización de anticuerpos.

- 50 Para la desnaturalización por calor, se calentó 1 ml de **mAb A** (después de la purificación en columna por afinidad de proteína A y neutralizada con Tris) a 80 °C durante 20 minutos en un tubo de ensayo Eppendorf. Se formó una precipitación visible después de calentar y enfriar. El tubo se centrifugó a 18.000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante se usó para el ensayo de proteínas (DO 280) y ensayo ELISA de la vitamina B₁₂. Para la
55 desnaturalización de SDS, se mezclaron 0,25 ml del fármaco con 0,75 ml de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,3 % en solución salina de fosfato (PBS) y se dejó a temperatura ambiente durante 1 día. El SDS adicional se eliminó mediante intercambio de tampón con PBS a través de un filtro centrífugo Amicon de corte de 50 kDa.

Análisis de mapeo de péptidos de la mezcla de reacción de fármaco-vitamina B₁₂ usando

- 60 **LC/MS/MS**. La muestra que contenía **mAb A** y vitamina B₁₂ se digirió con tripsina sin reducción o alquilación previa. La mezcla de reacción de intercambio de tampón se diluyó a 1 mg/ml usando el tampón de digestión (tris HCl 50 mM, cloruro de calcio 10 mM y urea 2 M, pH 7,6) antes de añadir la tripsina en una relación de enzima y proteína de 1:25 (peso/peso). Después de la incubación a 37 °C, la mezcla digerida se sometió directamente a análisis LC/MS/MS.
65 Aproximadamente 10 µg del digerido triptico se separaron cromatográficamente usando una UPLC Waters Acquity™ antes de analizarlos con un espectrómetro de masas ThermoFisher Q-EXACTIVE PLUS Orbitrap. Se usó una columna

Waters Acquity BEH CSH™ C18 (1,7 µm, 2,1x100 mm) para la separación (a 45 °C). Se usó un gradiente lineal del 1 % al 80 % de fase móvil B durante 60 minutos para eluir los péptidos (fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % y formiato de amonio 5 mM) en agua; fase móvil B: fórmico al 0,1 % y formiato de amonio 5 mM en acetonitrilo) a un caudal de 0,2 ml/min. El espectrómetro de masas Orbitrap se hizo funcionar en el modo de iones positivos con un voltaje de pulverización de 3,0 kV. La temperatura del calentador y la temperatura del capilar se fijaron en 300 °C y 275 °C, respectivamente. La adquisición de MS se realizó con una resolución de 70.000 y los 10 iones más intensos en cada ciclo de trabajo se seleccionaron para el análisis de MS/MS con una resolución de 17.500. Se habilitó la función de exclusión dinámica. Se usó energía de colisión normalizada de 25 para obtener espectros de fragmentación.

Para generar el color rosa son necesarios tanto mAb reducido con disulfuro como HO-Cbl. Durante la fabricación de mAbs, se observó que el color rosa generalmente aparecía en la etapa de elución de la proteína A, en la que se concentraron los mAb y se eliminó el color de fondo de las composiciones del medio. Analizamos el contenido de la vitamina B₁₂ por el método ELISA y descubrimos que el lote de color rosa tenía aproximadamente 20 veces más vitamina B₁₂ que un lote incoloro (**Tabla 1**, Lotes 1 contra 2).

Tabla 1. Unión de vitamina B₁₂ (VB12) y tioles libres de mAb B

Condiciones de mAb B	VB12 (pg/ml)	proteína (mg/ml)	VB12 (pg/mg)	N.º de grupo sulfhidrilo libre por molécula de proteína*
Lote 1, sin color rosa	1,10E+05	12,3	8,90E+03	0,2
Lote 2, color rosa	2,70E+06	14,8	1,80E+05	2,2
Lote 2, desnaturalizado por calor 85 °C x 20 min/sobrenadante	9,50E+04	0	NA	ND
Lote 2, después de tratarse con SDS al 0,3 % e intercambio de tampón	1,00E+06	3,2	3,10E+05	ND

Basándose en los pesos moleculares y las concentraciones de vitamina B₁₂ y mAb, el material coloreado tenía aproximadamente una molécula de vitamina B₁₂ en 47 moléculas de mAb. La vitamina B₁₂ tiene tres picos de absorción principales cerca de 360, 420 y 550 nm. El escaneo espectral reveló que el lote de color rosa tenía una mayor absorción que el lote incoloro más allá de 320 nm (Figuras 1A y 1B, líneas rojas frente a líneas moradas).

Se ha propuesto que la reducción del enlace disulfuro y la generación de grupos sulfhidrilo libres está asociada con la aparición del color rosa (Derfus GE et.al. *MABs* 2014, 6(3):679-688). El contenido de sulfhidrilo libre del lote de color rosa de mAb B tenía niveles de sulfhidrilo libre más altos que el lote incoloro (Tabla 1). Por otro lado, algunos lotes (N = 4 para mAb A y N = 2 para mAb B) con alto nivel de contenido de sulfhidrilo libre no tenían color rosa en el fármaco. Por ejemplo, El lote 2 de mAb A contenía un nivel más alto de grupos sulfhidrilo libres que el del lote 1, pero ambos lotes eran incoloros y tenían niveles similares de vitamina B₁₂ (Tabla 2). Estos resultados indican que los grupos sulfhidrilo libres son necesarios pero solos no son suficientes para generar un producto de color rosa.

Tabla 2. Unión de vitamina B₁₂ y tioles libres de mAb A

Condiciones de mAb A	Vitamina B ₁₂ (pg/ml)	proteína (mg/ml)	VB12 (pg/mg)	grupos sulfhidrilo libres por proteína*
Lote 1, sin color	2,00E+06	50	4,00E+04	0,4
Lote 1 + CN-Cbl	4,61E+06	41,1	1,12E+05	ND
Lote 1 + HO-Cbl	1,92E+07	44,5	4,32E+05	ND
Lote 2, sin color	1,32E+06	50	2,64E+04	3,1
Lote 2 + CN-Cbl	1,03E+07	42,1	2,45E+05	ND
Lote 2 + HO-Cbl	1,39E+08	44,1	3,15E+06	ND
Lote 2 + HO-Cbl tratado con H ₂ O ₂	7,18E+06	33,6	2,14E+05	0,3

La vitamina B₁₂ es un cofactor esencial para el cultivo de células de mamíferos. CN-Cbl, la forma más estable de la vitamina B₁₂, es la única fuente usada en el proceso de cultivo celular. Se ha informado que la luz puede convertir CN-Cbl en HO-Cbl, que es altamente reactivo con mAb (Prentice KM et.al.: *MABs* 2013, 5(6):974-981). Para demostrar la necesidad tanto de tioles libres de proteínas como de HO-Cbl reactivo para generar color rosa en el fármaco, se estableció un panel de ensayos incubando CN-Cbl o HO-Cbl con mAb A con niveles bajos (Lote 1) o altos (Lote 2) de contenido de sulfhidrilo libre. Las isoformas de vitamina B₁₂ y el mAb se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 día en la oscuridad. Después de la incubación, a continuación, la vitamina B₁₂ libre se eliminó por filtración. La cantidad de vitamina B₁₂ retenida (**Tabla 2**) indicó que (1) el HO-Cbl es mucho más activo que el CN-Cbl para formar complejos con el mismo lote de mAb, (2) que el fármaco con un nivel más alto de grupos sulfhidrilo libres era más reactivo que el fármaco con el nivel más bajo de grupos sulfhidrilo libres, y (3) la mayor incorporación de vitamina B₁₂ ocurrió en presencia de HO-Cbl y el fármaco con un alto nivel de grupo sulfhidrilo libre, y dio como resultado un aumento de más de 100 veces en la vitamina B₁₂. La diferencia de color proveniente de la cantidad de vitamina B₁₂ en cada muestra era evidente a simple vista (**Figura 2a**).

Los grupos sulfhidrido libres provienen de enlaces disulfuro reducidos en las proteínas. El fármaco del lote 2 mAb A tenía un promedio de 3,1 grupos sulfhidrido libres por molécula de proteína (Tabla 2) y se redujeron más del 95 % de las moléculas de anticuerpo (**Figuras 2b y 2c**). Se añadió peróxido de hidrógeno (0,1 % v/v) al material del Lote 2 y la mayoría (86,6 %) de las especies de bajo peso molecular (BPM) se convirtieron en monómero de anticuerpo (**Figuras 2b y 2c**). El material reoxidado tenía un nivel de sulfhidrido libre más bajo (medido después del tratamiento con H₂O₂ y antes de la incubación con HO-Cbl) y una reactividad más baja hacia HO-Cbl. Estos resultados demuestran que la generación del color rosa es una reacción de segundo orden cuya tasa depende de las concentraciones de ambos reactivos, concretamente, grupos sulfhidrido libres y HO-Cbl.

La vitamina B₁₂ se une covalentemente al anticuerpo. La bibliografía anterior no proporciona evidencia experimental de la naturaleza de la unión de vitamina B₁₂, aunque se sugirió una naturaleza no covalente (Derfus et al., 2014). La supuesta asociación no covalente requeriría la complementariedad estructural y de carga del anticuerpo con la vitamina B₁₂, por lo tanto, la alteración de la estructura de la proteína nativa liberaría la vitamina B₁₂ unida. Se usaron dos métodos de desnaturalización, tratamientos térmicos y SDS. El calentamiento a 85 °C durante 20 minutos provocó que el material de color rosa mAb B se desnaturalizara y precipitara. El sobrenadante, que contenía poca proteína, tenía sólo aproximadamente un 3,5 % del total de vitamina B₁₂ de la solución proteica de partida (**Tabla 1**). SDS desnaturaliza las proteínas uniéndose a la cadena principal peptídica y manteniendo la proteína desnaturalizada solubilizada en solución. El ensayo de vitamina B₁₂ indicó que la mayoría, si no toda, la vitamina B₁₂ todavía estaba asociada con la proteína desnaturalizada (Tabla 1). El cambio de movilidad del material coloreado se detectó en una electroforesis capilar no reducida-SDS (CE-SDS). Tanto el fármaco mAb A como el complejo mAb A-vitamina B₁₂ coloreado tenían múltiples bandas en CESDS no reducido debido a la reducción de disulfuro. Además de los picos que se superpusieron con los picos correspondientes en el material inicial, el material coloreado tenía picos adicionales que se desplazaban hacia el lado de mayor peso molecular y el cambio era más evidente en los picos de bajo peso molecular, tales como cadenas ligeras y pesadas individuales (**Figura 2d**). Esta observación puede explicarse fácilmente como la adición de moléculas de vitamina B₁₂ a mAb. En conjunto, estos resultados demuestran que la vitamina B₁₂ se asocia con proteínas desnaturalizadas y comigra con proteínas en condiciones desnaturalizadas. Por lo tanto, es improbable que la interacción entre la vitamina B₁₂ y mAb sea de naturaleza no covalente.

Tanto CN-Cbl como HO-Cbl se observaron en la digestión de tripsina mediante análisis LC/MS/MS. Las masas moleculares teóricas para CN-Cbl y HO-Cbl son de 1254,567 y 1345,567 Da respectivamente. El ion predominante observado para CN-Cbl es el ion de doble carga en m/z 678,293, correspondiente a CN-Cbl con una adición de dos protones. Sin embargo, el ion más predominante observado para HO-Cbl es el ion doblemente cargado en m/z 664,789 correspondiente a B12-OH con el ligando OH saliendo del compuesto de coordinación y agregando un protón. Los espectros MS/MS de las especies m/z 664,789 de HO-Cbl y m/z 678,293 de CN-Cbl se muestran en las Figuras 4A y 4B, respectivamente. Hay muchos iones de fragmentos comunes de los dos espectros MS/MS, incluidos los valores m/z de 147,09, 359,10, 456,72, 912,44 y 1124,45. El m/z 997,48 y 1209,49 en los espectros MS/MS de CN-Cbl se origina a partir de la especie con m/z 912,44 y 1124,45, sin perder el grupo CoCN.

Se encontraron enlaces covalentes coordinados entre la cobalamina y la IgG a través de la coordinación con varios residuos de cisteína mediante análisis LC/MS/MS del digerido triptico. Hay cinco residuos de cisteína en cada cadena ligera y once en cada cadena pesada. Sin embargo, se ha observado que solo cinco de ellos (L-C214, H-C134, H-C321, H-367, H-C425) forman complejos de coordinación con cobalamina por MS, como se enumera en la **Table 3**. L-C214 se encuentra en el extremo C de la cadena ligera y es el único residuo de cisteína de la cadena ligera que participa en la formación coordinada de enlaces covalentes.

Esto se demuestra por las masas observadas para el complejo péptido C-terminal L₁₉-Cbl (1635,646 Da) y el complejo péptido L₁₈₋₁₉ digerido incompleto-Cbl (2139,894 Da), con una precisión de masa de 2 ppm. Estos complejos coordinados también fueron confirmados por el análisis MS/MS. Los espectros MS/MS de estos dos complejos péptido-Cbl son muy similares, consistiendo principalmente en fragmentos de la cobalamina. La mayoría de los fragmentos de MS/MS se pueden identificar comparándolos con espectros de MS/MS de m/z 664,789 de especies de HO-Cbl. Como se muestra en las Figuras 4A y 4B, m/z 147,09, 359,10, 486,24 son exactamente iguales que en los espectros MS/MS de HO-Cbl. Adicionalmente, las especies con m/z 971,47 y 1.183,48 consisten en las mismas estructuras con m/z 912,44 y 1.124,45, más un cobalto (masa atómica 58,93 Da).

De forma similar, se han identificado cuatro cisteínas en la cadena pesada para formar enlaces coordinados con la cobalamina. H-C134 es la contraparte del enlace disulfuro con L-C214 en la región FAB. Los otros tres residuos de cisteína H-C321, H-C367 y H-C425 son las tres cisteínas C-terminales en la región Fc de la cadena pesada. Asimismo, H-C367 y H-C425 son puentes disulfuro emparejados en la IgG4 nativa.

Tabla 3 Complejo de péptido que contiene cisteína-cobalamina observado en el digerido triptico de mezcla de reacción de IgG-Vitamina B₁₂

Ubicación del residuo de cisteína	Péptido	Secuencia peptídica	masa peptídica calculada	Masa calculada para el complejo de cobalamina-péptido	Ion observado para péptido de cobalamina	Masa observada para el complejo cobalamina-péptido
L-C214	L18-19	SFNRGEC	811,328	2139,893	713,970 (3+)	2139,894
L-C214	L19	GEC	307,084	1635,648	818,327 (2+)	1635,646
H-C134	H10	GPSVFPLAPCSR	1229,623	2558,187	853,402 (3+)	2558,190
H-C321	H24	CK	249,115	1577,679	789,345 (2+)	1577,682
H-C367	H31	NQVSLTCLVK	1103,601	2432,165	811,395 (3+)	2432,169
H-C425	H36	WQEGNVFSCVMHEALHNHYTQK	2744,222	4072,787	1018,953 (4+)	4072,801

Conversión de luz de CN-Cbl a HO-Cbl y control del proceso de productos de color rosa. Como se ha analizado anteriormente, la reacción de color rosa es una reacción de segundo orden que depende de las concentraciones de molécula de anticuerpo reducida y HO-Cbl. Por lo tanto, se requieren estrategias de control del proceso para evitar la reducción de la molécula de anticuerpo y/o la generación de HO-Cbl. El control de la reducción del producto de anticuerpo es un proceso muy complicado que podría implicar el rediseño de anticuerpos (Peters S.J. et.al. *J. Biol. Chem.* 2012, 287(29):24525-24533; Aalberse R.C. et.al, 2002), composición del medio de cultivo (Trexler-Schmidt M. et.al. *Biotechnol Bioeng* 2010, 106(3):452-461), parámetros del proceso (Mun M. et.al. *Biotechnol Bioeng* 2015, 112(4):734-742) y tratamiento de la recolección (Trexler-Schmidt M. et.al, 2010). Controlar la cantidad del HO-Cbl evitando que la exposición a la luz visible sea una estrategia alternativa. Sin embargo, estas opciones pueden causar inconvenientes de operación y pueden ser específicas de la línea celular.

Abordamos este problema mediante la identificación de las longitudes de onda que causan la conversión CN-Cbl y establecimos una estrategia de control eliminando las longitudes de onda dañinas de las fuentes de luz. La vitamina B₁₂ tiene absorción de tanto luz visible como UVA (**Figura 1**). El medio de cultivo mAb A recién preparado se expuso bajo (1) luz de laboratorio normal que proviene de tubos de luz fluorescente blanca con una intensidad de 500-1.000 lux, o (2) luz visible intensificada proporcionada por una bombilla de luz fluorescente CFL, o (3) luz UVA intensificada centrada en 360 nm. El CN-Cbl y el HO-Cbl se separaron y cuantificaron por RP-UPLC (**Figura 4B**). Los resultados muestran que era la luz visible, no la luz UVA, la que causó principalmente que CN-Cbl se convirtiera en HO-Cbl (**Tabla 4**). La tasa de conversión fue una función de la iluminación general (intensidad x tiempo) tanto de la luz de laboratorio normal como de la luz visible de alta intensidad.

Tabla 4. La luz visible, no la luz UVA, es responsable de la conversión de CN-Cbl

Condiciones	Energía total *	VB12	
		% CN-B12	% HO-B12
Sin luz, control	0	100	0
Luz Rm (672 lux), 4 días	64,5	74,0	26,0
Luz Rm (672 lux), 7 días	113	63,8	36,2
Luz Rm (672 lux), 11 días	177	55,0	45,0
Luz Rm (672 lux), 14 días	226	47,8	52,2
Luz visible (7,3 klux), 1 día	175	64,0	36,0
Luz visible (7,3 klux), 4 día	701	32,7	67,3
Luz visible (7,3 klux), 7 día	1226	23,8	76,2
luz UVA (2,95 Watts/m ²), 1 día	70,8	83,4	16,6
luz UVA (2,95 Watts/m ²), 3 día	212,4	79,0	21,0

*La unidad de energía es Klux hora para luz visible y Watts/m² de luz UVA.

A continuación, investigamos el rango de longitudes de onda visibles (o colores) que pueden causar la conversión de CN-Cbl en función de la energía. Se usaron filtros de color seleccionados para generar luz con límites de longitud de onda específicos para aislar ciertas regiones del espectro de luz (Figura 4A). Como se muestra en la **Table 5**, el grado de conversión de CN-Cbl en función del tiempo de exposición a luz de diferentes colores. Ya que el vidrio de policarbonato puede bloquear la mayor parte de la luz UVA mientras es transparente a la luz visible, no se pudo evitar la conversión de CN-Cbl. La exposición a la luz roja cuya longitud de onda es superior a 600 nm tuvo la tasa más lenta de conversión de CN-Cbl (Figura 4d). Por el contrario, tanto la luz verde (Figura 4e) como la luz azul tienen tasas mucho más altas de conversión CN-Cbl. CN-Cbl tiene picos de absorción a 420 nm y regiones de 500 a 550 nm que se superponen con los espectros de luz azul y verde usados en este estudio. Estos resultados proporcionan evidencia sólida para respaldar nuestra visión de que la luz de diferentes colores tiene un impacto diferente en la conversión de CN-Cbl y solo las longitudes de onda superiores a <600 nm pueden causar la conversión de CN-Cbl.

Tabla 5. Impacto de la luz de color sobre la conversión de CN-Cbl

Filtros	Condiciones	%B12-CN	% B12-OH
Control, envuelto en oscuridad	almacenado a 4 °C hasta que todas las muestras estén listas para el análisis	95	5
envuelto en oscuridad	Temp. amb., 14 días	93	7
envuelto en oscuridad	Temp. amb., 26 días	84	16
luz blanca CFL	0,3 millones de lux hora	57	43
luz blanca CFL	0,6 millones de lux hora	25	75
luz blanca CFL	1,2 millones de lux hora	6	94
luz CFL, lámina de policarbonato	0,4 millones de lux hora	41	59
luz CFL, lámina de policarbonato	0,6 millones de lux hora	17	83
luz CFL, lámina de policarbonato	1,7 millones de lux hora	0	100
Filtro rojo primario	0,3 millones de lux hora	88	12

(continuación)

Filtros	Condiciones	%B12-CN	% B12-OH
Filtro rojo primario	0,6 millones de lux hora	83	17
Filtro rojo primario	1,2 millones de lux hora	76	24
Filtro verde primario	0,3 millones de lux hora	52	48
Filtro verde primario	0,6 millones de lux hora	23	77
Filtro verde primario	1,2 millones de lux hora	7	93
Filtro azul oscuro	0,3 millones de lux hora	3	97
Filtro ámbar intenso	0,3 millones de lux hora	57	43
Filtro ámbar intenso	0,6 millones de lux hora	52	48
Filtro ámbar intenso	1,2 millones de lux hora	23	77

Uso de la luz de color rojo en el entorno de fabricación como estrategia de control del color rosa. El uso de luz roja en lugar de luz de fluorescencia blanca normal se ensayó en un entorno de laboratorio. El mAb A reducido (producto del Lote 2 en la Tabla 2) se añadió al medio de cultivo a una concentración de mAb A similar a la del cultivo celular real en el momento de la recolección. Los medios de cultivo habían sido previamente expuestos a luz blanca, luz roja o verde (1,2 millones de lux hora). Después de la incubación durante la noche (20 horas) en la oscuridad, el mAb se purificó mediante una columna de proteína A y se midió la vitamina B₁₂ unida por ensayo ELISA. Como se muestra en la **Tabla 6**, había más unión de vitamina B₁₂ en el medio expuesto a la luz blanca y verde que en el medio expuesto a la luz roja y el control oscuro. Estos resultados indican que la luz roja, en efecto, puede proteger a CN-Cbl de la conversión.

Tabla 6. Un fármaco mAb A introducido en CB expuesto a luz de varios colores

Condiciones	Proteína (mg/ml)	VB12 (pg/ml)	VB12 (pg/mg)
control CB (control oscuro, 26 días) + DS	1,57	1,38E+04	8813
Luz CB CFL blanca (1,2 mluxhr) + DS	1,58	1,17E+05	73861
Filtro rojo CB (1,2 mluxhr) + DS	1,56	1,36E+04	8704
Filtro verde CB (1,2 mluxhr) + DS	1,74	5,51E+04	31646

Ejemplo 2

Uso de peróxido de hidrógeno para evitar la reducción de enlaces disulfuro de anticuerpos durante el proceso de fabricación

Soluciones madre de proteína

En este estudio se usaron dos moléculas de IgG4 (**1 y 2**) y dos moléculas de IgG1 (**3 y 4**). Las moléculas de IgG4 tenían una sola mutación puntual de serina a prolina en el motivo de la región bisagra CPSC de la IgG4 original para parecerse a la estructura de enlace disulfuro entre cadenas de IgG1 CPPC (Liu H. et.al. *MAbs*. 2012;4:17-23, Aalberse R.C. et.al. *Immunology* 2002;105:9-19). Todos los mAb se produjeron en cultivo de células CHO con viabilidades celulares que oscilaban entre el 50 y el 90 %. El volumen clarificado (CB) generalmente se generó con filtración profunda a menos que se especifique lo contrario, en cuyo caso se generó por centrifugación. El cultivo celular de **mAb 1** en algunos casos se trató con pH bajo más sulfato de dextrano antes de la filtración profunda. La purificación posterior se logró mediante cromatografía de proteína A, las etapas cromatográficas de pulido adicionales y una etapa final de ultrafiltración/diafiltración en un tampón basado en azúcar de histidina. Las concentraciones de proteína se determinaron por absorción a 280 nm (A280) por un espectrómetro Dropsense-96 (Trinean NV, 9050 Gante, Bélgica).

Ensayo de contenido de sulfhidrilo libre (tiol)

El método usó ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoico (DTNB) con una ligera modificación de la bibliografía (Arner E.S. et.al. *Methods Enzymol.* 1999;300:226-239. Resumiendo, se mezcló una muestra de 10 ml de volumen clarificado o fármaco (DS) con 15 ml de tampón TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, pH 7,6) en una placa de 96 pocillos. Se mezcló recién solución de DTNB (5 mg/ml en etanol; Sigma-Aldrich, D8130) con guanidina-HCl 8 M en Tris 0,2 M (pH 8) en una relación de volumen de 1:9 antes de su uso. Se añadieron 100 µl de la solución de DTNB/guanidina a cada pocillo y se mezclaron. Se ensayaron muestras duplicadas. Se midió la absorción espectral a 412 nm y se usó un valor de coeficiente de extinción molar de 13.600 M⁻¹ cm⁻¹ para el cálculo del contenido de tiol libre.

Ensayos de indicadores redox

Se disolvió 2, 6-diclorofenolindofenol (D2932, Spectrum Chemical MFG Corp, Gardena, CA) en agua para preparar una solución madre fresca al 1 %. La forma oxidada de 2, 6-diclorofenolindofenol era azul a pH neutro y se volvió

incolora cuando se redujo. En pH ácido, la forma oxidada de 2, 6-diclorofenolindofenol era púrpura y cambió a incolora cuando se redujo. Para determinar el rango de color de DCPIP para muestras reducidas y no reducidas, se mezcló el 100 % del lisado celular **mAb 2** con un volumen clarificado normal producido por centrifugación para generar una serie de diluciones al 0, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 % de lisado celular. El contenido de tiol libre de cada dilución se midió inmediatamente y se representó en una gráfica en función de la dilución (**Figura 6D**). Se añadió DCPIP (10 ml) a las diluciones de lisado celular en serie (1 ml a temperatura ambiente) para determinar qué dilución mostró un cambio de color mediante inspección visual en una duración de unos pocos segundos a minutos.

Calibrador no reducido y reducido

El sistema LabChip GXII Touch HT (PerkinElmer) se usó para el análisis de pureza de mAb en condiciones reductoras (R_Calibrador) y no reductoras (NR_Calibrador) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. NR_Calibrador fue la herramienta más conveniente, de alto rendimiento para separar y cuantificar los fragmentos de anticuerpos, incluyendo 2 cadenas pesadas 1 ligera (HHL), una cadena pesada una ligera (HL), cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC). Se usó cromatografía de exclusión por tamaño para hacer un seguimiento del mAb intacto y especies de alto peso molecular (APM).

Medición espectrométrica de masas de oxidación de anticuerpos para mAb

Las muestras de **mAbs 2 y 3** se redujeron por ditiotritol, alquilado por yodoacetamida y digerido con tripsina. El digerido triptico se separó cromatográficamente usando un sistema de UPLC Waters ACQUITY (Milford, MA, EE. UU.) antes de analizarlo con un espectrómetro de masas Thermo Scientific Orbitrap Q-EXACTIVETM PLUS (Bremen, Alemania). Se usó una columna Waters Acquity BEH C18 (1,7 mm, 2,1 y 150 mm) para la separación (a 40 °C). Se usó un gradiente lineal del 2 % al 80 % de fase móvil B durante 110 minutos para eluir los péptidos (fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua; fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo) a un caudal de 0,2 ml/min.

El espectrómetro de masas Q Exactive Plus se operó en modo dependiente de los datos para cambiar entre la adquisición de MS y MS/MS. Los iones se generaron utilizando un caudal de gas envolvente de 40, un caudal de gas auxiliar de 10, una tensión de pulverización de 3 kV, una temperatura capilar de 275 °C y un nivel de RF S-Lens de 60. La resolución se fijó en 70.000 (objetivo de AGC 3e6) y 17.500 (objetivo de AGC 1e5) para barridos de sondeo y eventos de MS/MS, respectivamente. Se usó la duración de exclusión dinámica de 10 s con un solo recuento repetido. La cuantificación relativa se logró dividiendo las áreas de los picos de los péptidos oxidados por la suma de los péptidos nativos y los péptidos oxidados en los cromatogramas de iones seleccionados de los barridos de sondeo.

Peróxido de hidrógeno y otros tratamientos con peróxido

Se diluyó recién una solución madre al 30 % de peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich cat. 216763, densidad de 1,11 g/ml) con agua al 3 % de solución madre (v/v, igual a 980 mM) antes de su uso. La solución madre al 3 % se añadió al cultivo celular o CB a concentraciones finales de 0,1 a 20 mM según se desee. Para probar el efecto del peróxido de hidrógeno en la reducción del disulfuro de anticuerpos, se agregó solución madre de peróxido de hidrógeno al CB a concentraciones finales de 0, 0,1, 0,33, 1, 3, 5, 10 o 20 mM.

También se ensayaron dos productos químicos inorgánicos que contenían peróxido de hidrógeno, percarbonato de sodio (Sigma-Aldrich, Cat. 371432, $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$) y perborato de sodio (Sigma-Aldrich, Cat. 372862, $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Tanto el percarbonato de sodio como el perborato de sodio se someten a hidrólisis al entrar en contacto con el agua, produciendo peróxido de hidrógeno y carbonato o borato, respectivamente.

Modelo a pequeña escala de la reducción de enlaces disulfuro

Se llenó una botella de 500 ml con una tapa aspirada (FlexBioSys, Cat FXB-500M-0005) con 300 ml de volumen clarificado. Como alternativa, una bolsa BioProcess de 50 ml (ThermoFisher, Cat SH30658.11) se llenó con 30 ml de volumen clarificado. El envase se conectó a una línea de suministro de gas nitrógeno puro y se lavó con gas nitrógeno ($\leq 34.473,8 \text{ Pa}$ ($\leq 5 \text{ psi}$)) a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas y, a continuación, se mantuvo encerrado en condiciones sin aire durante 1 día. Después de la espera, la muestra se analizó mediante el ensayo de tiol libre inmediatamente o se mezcló con yodoacetamida (concentración final 20 mM) antes de ser analizada por NR_Calibrador.

Para generar el peor de los casos para la reducción de enlaces disulfuro de anticuerpos, el 100 % de la alteración celular se indujo artificialmente mediante alteración mecánica. El cultivo celular se centrifugó (500 g durante 20 min), el sedimento celular se resuspendió en 1/10 del volumen original en tampón RIPA (ThermoFisher, Cat. 8990. Tris 25 mM, NaCl 150 mM, SDS al 0,1 %, desoxicolato sódico al 1 %, NP-40 al 1 %, pH 7,6) y lisado a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación, a continuación, se enfrió en hielo y se pasó a través de un homogeneizador de tejidos a alta velocidad durante 3 min. Se asumió que estas etapas lograron la lisis celular total. A continuación, el material lisado se volvió a añadir al sobrenadante centrifugado. Este lisado celular se introdujo en bolsas de 50 ml con o sin peróxido de hidrógeno, a continuación, se lavó con gas nitrógeno y se mantuvo en condiciones sin aire a temperatura ambiente durante 1 día como se ha descrito anteriormente. Después de la incubación, el lisado celular se

centrifugó dos veces a 3.000 g durante 60 minutos a 4 °C, se pasó por un filtro de 0,2 micras y se analizó como se ha descrito anteriormente.

Tratamiento con peróxido de hidrógeno y su efecto sobre los atributos de calidad del producto

Para el **mAb 4**, el fluido de cultivo celular de biorreactores a escala de laboratorio se usó para los siguientes dos experimentos. En el primer experimento, el volumen clarificado se generó mediante centrifugación y filtración usando un filtro de 0,2 micras. El volumen clarificado resultante se (a) almacenó a 4 °C durante 4 días como control o (b) se combinó con peróxido de hidrógeno hasta una concentración final de 10 mM de peróxido y se almacenó a 4 °C durante 4 días. En el segundo experimento, se agregó peróxido de hidrógeno al fluido de cultivo celular (con células), incubado a temperatura ambiente durante 1 hora antes de la centrifugación. El volumen clarificado resultante se (a) almacenó a 4 °C durante 4 días como control o (b) se colocó a temperatura ambiente el tercer día y se lavó con gas nitrógeno, y se mantuvo a temperatura ambiente durante otro día.

Todas las muestras resultantes se procesaron a través de cromatografía de proteína A seguida de etapas de inactivación viral a pH bajo y neutralización usando condiciones de punto central del proceso. Los atributos de calidad del producto se evaluaron mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento de exclusión por tamaño para analizar los niveles de anticuerpos intactos y agregados, mediante enfoque isoelectrico capilar con imágenes para la distribución de variantes de carga, y mediante calibrador en condiciones reducidas y no reducidas para la pureza. Las impurezas del proceso se estimaron mediante ELISA para las proteínas de la célula hospedadora y mediante qPCR para el ADN residual.

Para el **mAb 2**, se añadió peróxido de hidrógeno al volumen clarificado a una concentración final de 0, 3, 5 y 10 mM, a continuación, se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 día bajo lavado con gas nitrógeno. Las muestras resultantes se procesaron mediante cromatografía de proteína A de alto rendimiento antes del análisis.

Reducción de enlaces disulfuro durante la fabricación

La reducción de mAbs se ha observado en el proceso de desarrollo de varias moléculas de anticuerpos IgG1 e IgG4, ya sea en el volumen clarificado (CB) o en el eluido de proteína A (PAE).

Al igual que con otros grupos, observamos la acumulación de tiol libre total en el volumen clarificado durante la recolección y la recuperación primaria (WO 2015/085003, Ruaudel J., et al. *BMC Proceedings* 2015;9(9):24). La diferencia en las concentraciones de tiol libre entre muestras de volumen clarificado de **mAb 1** que mostró reducción de disulfuro frente a muestras que no lo hicieron fue significativa (**Figura 5A**). En el caso de mAb 1, cuando el nivel de tiol libre en el volumen clarificado fue inferior a 100 mM, hubo bajo riesgo de generación de bajo peso molecular; un nivel de tiol libre de 100-200 mM planteaba un riesgo potencial; y el nivel de tiol libre por encima de 200 mM era un alto riesgo de generación de bajo peso molecular. Vale la pena señalar que el reactivo de Ellman (ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoico; DTNB) reacciona con grupos sulfhidrilo de moléculas pequeñas que contienen sulfhidrilo, como el glutatión reducido, cisteína y ácido lipoico, además de los grupos sulfhidrilo libres en las proteínas. Por tanto, el nivel de referencia del nivel de tiol libre depende de las líneas celulares, la composición del medio de cultivo (pequeñas moléculas que contienen sulfhidrilo) y la viabilidad celular. Sin embargo, cuando se produjo la reducción de los enlaces disulfuro, el nivel de tiol libre tendía a ser mucho más alto que la línea de base.

El nivel de tiol libre en un volumen clarificado es muy dinámico y pertenece a las composiciones y el proceso de manipulación. Además de la exposición al aire, otros factores tales como la temperatura de almacenamiento y el pH también contribuyen a la dinámica. El ajuste del pH del volumen clarificado de **mAb 1** de 7 a 4,8, seguido de la eliminación de las células por filtración profunda condujo a una pequeña disminución en el nivel de tiol libre y el porcentaje de bajo peso molecular que se observó (**Figuras 5B y 5C**). Cuando la recolección de células se trató con una combinación de pH 4,8 y sulfato de dextrano (0,05 g/l y mezclado durante 60 minutos seguido de centrifugación y filtración), el nivel de tiol libre se redujo significativamente, consistente con la observación de que la floculación elimina las proteínas de la célula hospedadora, incluyendo Trx/TrxR y Glu/GR y también puede eliminar algunas moléculas pequeñas que contienen sulfhidrilo. El nivel de tiol libre también varió con la temperatura. La incubación del volumen clarificado de control a 37 °C durante 75 min provocó una caída del 60 % del contenido de tiol libre. Sin embargo, si se agregaba 1 mM de NADPH, un componente necesario para las reacciones TrxR y GR, a las soluciones antes de la incubación a 37 °C, se observó un aumento del nivel de tiol libre en el control y el CB ajustado por pH (**Figura 5A**). Estos cambios dinámicos indican que debe hacerse un seguimiento del nivel de tiol libre en las etapas previas y posteriores a la recolección para poder pronosticar mejor el riesgo de generación de bajo peso molecular.

Uso de indicadores redox para predecir la reducción de enlaces disulfuro

Puesto que la reducción del enlace disulfuro es una reacción redox, es posible utilizar indicadores redox como una forma simple, rápida y robusta de reemplazar la prueba DTNB y pronosticar el riesgo potencial de formación de bajo peso molecular durante la recolección y la recuperación. Un indicador redox experimenta un cambio de color definitivo a un potencial de electrodo específico de manera similar a como los indicadores de pH experimentan un cambio de color a un pH específico. Para encontrar el indicador redox apropiado, se ensayó una variedad de indicadores redox

disponibles en el mercado y se identificaron varios como los mejores candidatos potenciales que se pueden usar en el proceso de fabricación de productos biológicos.

Un ejemplo de indicador redox es el 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP, **Figura 6A**). Su color cambió en el fármaco purificado **mAb 2**, que tenía un alto porcentaje de bajo peso molecular (**Figura 6B**), y su color puede cambiar total o parcialmente o nada en el volumen clarificado con nivel alto, medio y bajo de tioles libres, respectivamente (**Figura 6C**). Para determinar el rango de cambio de color DCPIP, la solución madre de DCPIP se añadió a una dilución en serie de lisados celulares de mAb 2 con concentraciones conocidas de tiol libre (**Figura 6D**). DCPIP experimentó un cambio de color en CB de mAb 2 con un 3-5 % de lisado celular y concentraciones de tiol libre en un intervalo de 80-100 mM. Por lo tanto, cuando una muestra de volumen clarificado tuvo una concentración de tiol libre superior a 100 mM, el DCPIP cambió de color y esta característica convierte al DCPIP en un método rápido y fácil de usar para pronosticar el riesgo de reducción de enlaces disulfuro durante la fabricación.

Se diseñó un estudio para examinar si el cambio de color en DCPIP se correlacionaba con los niveles de tiol libre y podía predecir correctamente la generación de bajo peso molecular (**Figura 6E**). El volumen clarificado **mAb 3** se generó mediante filtración profunda con aire o con gas nitrógeno lavando el tren de filtración antes del procesamiento. El lavado con gas nitrógeno se usó para generar una condición "sin aire" en la que no había oxígeno expuesto al fluido durante el proceso de recolección. El volumen clarificado resultante se dividió en alícuotas en recipientes pequeños con un 0, 20, 50 y 100 % de volumen del espacio de cabeza con superposición de aire al volumen líquido y se incubaron a 4 °C, 24 °C y 37 °C durante un día. Como se muestra en la **Tabla 7**, la presencia de aire durante la recolección y la recuperación fue fundamental para evitar la generación de bajo peso molecular. En este caso, el volumen clarificado inicial tenía una concentración de tiol libre más baja (51 mM) en comparación con la condición sin aire (207 mM) y el nivel de oxígeno disuelto (OD) fue suficiente (≥ 37 %) para suprimir la generación de bajo peso molecular incluso durante las condiciones de mantenimiento del porcentaje de superposición de aire y a diferentes temperaturas.

Por el contrario, el % de superposición de aire durante el mantenimiento se volvió importante para el volumen clarificado generado en la condición sin aire. El peor de los casos fue una recolección sin aire y un mantenimiento sin aire, donde el monómero mAb intacto disminuyó del 96,5 % al 81,6 %. Además, cuando la superposición de aire fue del 20 % o más, no se produjo reducción de disulfuro. La temperatura de incubación tuvo un efecto diferente sobre la concentración de tiol libre. Las concentraciones más altas de tiol libre y la reducción máxima ocurrieron a un mantenimiento a 24 °C. La cantidad de tiol libre después de mantenerse a 4 °C fue cercana a la cantidad antes del mantenimiento. Se supuso que el mantenimiento a 37 °C era la temperatura óptima para la actividad enzimática de TrxR y GR. Sin embargo, causó universalmente una disminución en las cantidades de tiol libre en todas las condiciones, y los datos fueron consistentes con los resultados de **mAb1** como se muestra en la **Figura 5**.

Tabla 7. Concentraciones de tiol libre y cambio de color de DCPIP en el volumen clarificado de **mAb 3** generado y mantenido en diversas condiciones con y sin aire.

Exposición al aire durante la recolección (S/N)	Cantidad de superposici ón de aire (% de líquido)	Temperatura en almacenamie nto	% de saturación de aire	% de saturación de CO2	Concentraci ón del grupo SH libre (mM)	Cambio de color de DCPIP	NR Calibrador % monómer o
S	NA	0	NA	NA	51	NA	96,5
N	NA	0	NA	NA	207	NA	96,5
S	0	37	37	6,4	36	Azul	95,1
S	0	24	91,3	7,1	42	Azul	95
S	0	4	100	7,5	46	Azul	96,3
S	20	37	77,8	6,1	36	Azul	94,9
S	20	24	100	6,4	46	Azul	96,4
S	20	4	100	6,9	47	Azul	96,6
S	50	37	84,1	5,3	38	Azul	95
S	50	24	100	6,3	47	Azul	96,3
S	50	4	100	6,9	49	Azul	96,5
S	100	37	96,1	4,7	34	Azul	94,9
S	100	24	100	5,4	70	Azul	95,8
S	100	4	100	6,2	49	Azul	96,2
N	0	37	38,2	6,4	38	Azul	96
N	0	24	14,7	9,7	335	incoloro	81,6
N	0	4	36	7,3	171	incoloro	96,3
N	20	37	70,1	5,5	34	Azul	95,4

Exposición al aire durante la recolección (S/N)	Cantidad de superposici ón de aire (% de líquido)	Temperatura en almacenamie nto	(continuación)		Concentraci ón del grupo SH libre (mM)	Cambio de color de DCPIP	NR Calibrador % monómer o
			% de saturación de aire	% de saturación de CO ₂			
N	20	24	62,9	7,5	84	Parcial	96,7
N	20	4	92,9	6,9	121	cambio incoloro	96,6
N	50	37	85,5	4,7	33	Azul	95,7
M	50	24	86,3	6,6	83	Parcial	96,1
N	50	4	100	6,2	133	cambio incoloro	96,8
N	100	37	95,4	4	34	Azul	95,6
N	100	24	96,6	5,4	81	Parcial	96,5
N	100	4	100	5,3	138	cambio incoloro	96,2

NA: No aplicado

Al final del estudio de mantenimiento durante 1 día, cada muestra se mezcló con solución madre de DCPIP. El cambio de color se evaluó por observación visual (**Figura 6F**). La **Tabla 7** mostró que la secuencia de cambio de color tenía una fuerte correlación con las concentraciones de tiol libre; cuanto mayor fue la concentración de tiol libre, más rápido se produjo el cambio de color de DCPIP. Todas las muestras que se recolectaron en condiciones aireadas no mostraron ningún cambio de color.

De manera similar también se probaron indicadores redox adicionales con diferentes potenciales de reducción estándar, se encontró que la tionina y el azul de metileno cambiaron de color a niveles de tiol libre de 600-800 y >1.000 mM (datos no mostrados), respectivamente. Estos tintes se pueden juntar para formar una escalera de indicadores para pronosticar rápidamente el nivel de riesgo durante la fabricación.

Un modelo a escala reducida para recapitular la reducción de enlaces disulfuro durante la recolección y la recuperación primaria

Una gran cantidad de evidencia sugiere que la reducción del enlace disulfuro está correlacionada con la lisis celular durante la operación de recolección y con el volumen clarificado que se mantiene en recipientes cerrados (por ejemplo, bolsas desechables) sin una cantidad suficiente de aire a temperatura ambiente a lo largo del tiempo (Mun M. et. Alabama. *Biotechnol Bioeng* 2015;112:734-742). En consecuencia, se desarrolló un modelo a pequeña escala para imitar este fenómeno llenando una pequeña cantidad de volumen clarificado (10 a 300 ml) en un recipiente sellable y generando condiciones sin aire mediante el lavado con gas nitrógeno y manteniendo a temperatura ambiente seguido de análisis NR_Calibrador para bajo peso molecular (**Figura 7**).

Puesto que el volumen clarificado de la operación de fabricación puede variar de un lote a otro en términos de daño celular y tiempo de retención en varias etapas desde antes de la recolección hasta después de la recolección, el contenido de bajo peso molecular puede variar en un amplio intervalo desde un pequeño porcentaje hasta casi el 100 %. Para simular los estudios a pequeña escala, se generó el peor de los escenarios (descrito en materiales y métodos anteriormente) en el que el lisado celular de las células CHO se mezcló con el sobrenadante del volumen original del cultivo celular para simular el 100 % de la lisis celular y dio como resultado la generación de bajo peso molecular incluso en presencia de aire (**Figura 8A**). Llenado en un recipiente sellable, se lavó con gas de nitrógeno y se incubó a temperatura ambiente durante 1 día. En estas condiciones, todas las moléculas de anticuerpo **mAb 2** intactas en el volumen clarificado se fragmentaron por completo (**Figuras 8B y 9B**). El contenido de tiol libre en el 100 % del volumen clarificado por lisis celular se midió de 1 a 3 mM, que era al menos 10 veces superior al del funcionamiento normal.

El peróxido de hidrógeno puede inhibir la reducción de los enlaces disulfuro

Una forma de controlar la reducción de los enlaces disulfuro en los mAb es eliminar el potencial reductor contenido en el volumen clarificado antes de que se reduzcan los mAb. Se ensayó el uso de H₂O₂ para este fin. Como se muestra en la **Figura 7**, el volumen clarificado de **mAb 2** control generó aproximadamente un 20 % de bajo peso molecular después de mantenerse en condiciones sin aire a temperatura ambiente durante 1 día (**Figura 7C**). Se agregó peróxido de hidrógeno al mismo volumen clarificado en concentraciones de 0,33, 1 y 3 mM antes del mantenimiento sin aire. Los resultados mostraron que el peróxido de hidrógeno 3 mM (aproximadamente el 0,01 %) puede impedir por completo la generación del bajo peso molecular (**Figuras 7E, 7G y 7I**). Estos resultados indican que el peróxido de hidrógeno impide eficazmente la reducción de enlaces disulfuro.

Para determinar la concentración mínima de H_2O_2 necesaria para inhibir la generación de bajo peso molecular en el peor de los casos, se usó el modelo de cultivo de células lisadas al 100 % descrito anteriormente. En este estudio, el cultivo de células lisadas al 100 % se mantuvo en condiciones sin aire en presencia de 0, 5 o 10 mM de H_2O_2 . Después de 1 día de mantenimiento, permanecieron las moléculas de anticuerpo **mAb2** intactas y las especies de bajo peso molecular estaban dominadas por cadenas ligeras y pesadas con una fracción menor de medio mero, lo que sugiere que la reducción fue casi completa en comparación con la muestra de control que se expuso al aire (**Figuras 9A y 9B**). La adición de 5 mM y 10 mM de H_2O_2 puede parcialmente (**Figura 8C**) y completamente (**Figura 8D**) inhibir la generación de bajo peso molecular, respectivamente. Estos resultados de NR_Calibrador de CB sin purificar se resumieron en la **Figura 8E**. Después de la purificación de la Proteína A, las muestras con H_2O_2 0, 5 y 10 mM tenían un 0, 10,1 y 98,3 % de monómero de anticuerpo puro, respectivamente, de los resultados de NR_Calibrador (**Figura 8F**). La muestra que se expuso al aire tenía un 83 % de monómero de anticuerpo puro. Estos resultados confirman que H_2O_2 10 mM puede impedir eficazmente la reducción de mAb en el peor de los casos del procesamiento del volumen clarificado.

Hay muchos compuestos que contienen peróxido, inorgánicos u orgánicos, que pueden ser sustituidos por peróxido de hidrógeno. Se ensayaron dos formas inorgánicas, percarbonato de sodio y perborato de sodio, como un sustituto del peróxido de hidrógeno. Los resultados muestran que ambos peróxidos pueden suprimir eficazmente la reducción de los enlaces disulfuro de una manera dependiente de la concentración (**Figura 9**).

Tratamiento con peróxido de hidrógeno y oxidación de moléculas de anticuerpos

Una de las principales preocupaciones del uso de peróxido de hidrógeno es su potencial para oxidar los mAbs. Los residuos de metionina son más susceptibles a la oxidación con peróxido de hidrógeno. (Luo Q., et al. *J. Biol. Chem.* 2011;286:25134-25144, Stracke J., et al. *MAbs*. 2014;6:1229-1242). Se analizaron los **mAbs 2 y 3** (pertenecientes a las subclases IgG4 e IgG1, respectivamente) por espectrometría de masas para la oxidación de metionina después de varios tratamientos con peróxido de hidrógeno. Para ambas moléculas, después de la adición de H_2O_2 (1 mM a 10 mM) e incubación a temperatura ambiente durante 1 día, se observó un pequeño aumento en la oxidación que dependía de la concentración de H_2O_2 en el mismo lote de muestras que estaban bajo los tratamientos de peróxido de hidrógeno descritos (**Tablas 8 y 9**). Sin embargo, los cambios de oxidación inducidos por H_2O_2 fueron insignificantes para ambos mAbs 2 y 3, ya que el mapeo de péptidos tripticos y el método LC-MS/MS tienen una variación del 1 %.

Estos resultados indican que, bajo concentraciones óptimas de peróxido, la oxidación de mAb mediada por peróxido de hidrógeno u otros peróxidos no muestra un aumento significativo y puede controlarse el nivel de oxidación.

Tabla 8. Oxidación de residuos de metionina de mAb 2 después del tratamiento con peróxido de hidrógeno

Condiciones de mAb 2			% de Oxidación			
Biorreactor	Generación de CB	mantenimiento	H_2O_2 (mM)	(%H18ox, M252)	(%H30ox, M358)	(%H36ox, M428)
1	centrífuga	Sin retención	0	5,8	2,4	2,3
1	centrífuga	sin aire	0	6,1	2,7	2,3
1	centrífuga	sin aire	3	6,3	2,7	2,2
1	centrífuga	sin aire	5	6,3	2,8	2,3
1	centrífuga	sin aire	10	6,4	2,8	2,5
1	filtración profunda	aire	0	5,4	2,5	2
1	filtración profunda	sin aire	0	5,6	2,6	2,1
1	filtración profunda	sin aire	5	5,8	2,7	2,2
1	filtración profunda	sin aire	10	5,9	2,7	2,2
2	centrífuga	aire	0	3,7	2,7	4,3
2	centrífuga	sin aire	0	3,7	2,7	4,3
2	centrífuga	sin aire	5	3,7	2,8	4,7
2	centrífuga	sin aire	10	3,9	2,8	4,9
3	centrífuga	aire	0	3,8	3,1	4,9
3	centrífuga	sin aire	0	3,9	3	5,3

Tabla 9. Oxidación de residuos de metionina de mAb 3 después del tratamiento con peróxido de hidrógeno

Condiciones de mAb 3		mantenimiento	H ₂ O ₂ (mM)	% de Oxidación						
Biorreactor	Generación de CB			%H3ox	%H10ox	%H12ox*	%H13ox	%H22ox	%H36ox	%H42ox
1	Filtración profunda	sin retención	0	0,5	1,2	0,9	1,2	1,3	1,4	0,6
1	Filtración profunda	sin aire	0	0,5	1,2	0,9	1,2	1,3	1,9	0,7
1	Filtración profunda	sin aire	1	0,5	1,3	1	1,1	1,4	2	0,7
1	Filtración profunda	sin aire	2	0,5	1,3	1	1,2	1,4	2	0,7
1	Filtración profunda	sin aire	3	0,5	1,3	1	1,2	1,5	2	0,7
1	Filtración profunda	sin aire	5	0,5	1,4	1,1	1,2	1,5	2,1	0,7
2	Centrifuga	aire	0	2,9	0,7	ND	0,9	1,5	1,7	0,5
2	Centrifuga	sin aire	0	2,8	0,7	ND	1	1,9	1,7	0,5
2	Centrifuga	sin aire	1	2,9	0,8	ND	0,9	1,9	1,7	0,5
2	Centrifuga	sin aire	5	3,2	0,9	ND	1,3	1,6	1,8	0,5
2	Centrifuga	sin aire	10	3,6	0,9	ND	1,2	1,7	1,9	0,6

Efectos del tratamiento con peróxido de hidrógeno en los atributos de calidad del producto

Además de la oxidación, los efectos potenciales del peróxido de hidrógeno en otros atributos de calidad del fármaco y el proceso de purificación posterior también se evaluaron en un estudio a escala de laboratorio. El diseño experimental incluyó tanto **mAb 2** (una IgG4) como **mAb 4** (una IgG1). Para el **mAb 4**, el peróxido de hidrógeno se agregó al fluido de cultivo celular previamente a la recolección y el volumen clarificado posteriormente a la recolección (sin células). Después de varios tratamientos con peróxido de hidrógeno, el volumen clarificado resultante se procesó a través de cromatografía de Proteína A, seguido de las etapas de inactivación viral y neutralización de pH bajo usando condiciones puntuales del proceso central antes del análisis. Los resultados analíticos de **mAb 4**, mostrados en la **Table 10**, indicó que no hubo cambios notables en todos los atributos que se ensayaron entre las muestras tratadas con peróxido de hidrógeno y las no tratadas. Las impurezas del proceso (proteínas de la célula hospedadora y ADN residual) también fueron comparables con el control y aceptables dentro del intervalo del proceso (datos no mostrados). También se obtuvieron resultados similares para **mAb 2** que se trató con H₂O₂ 0, 3, 5 y 10 mM a temperatura ambiente durante 1 día (**Tabla 10**).

Por lo tanto, estos resultados indican que los tratamientos con peróxido de hidrógeno (hasta 10 mM) no tienen cambios notables en todos los atributos que se ensayaron en muestras tratadas con peróxido de hidrógeno antes y después de la eliminación de células.

Tabla 10. Tratamiento con peróxido de hidrógeno sobre los atributos de calidad del producto de los mAbs 2 y 4.

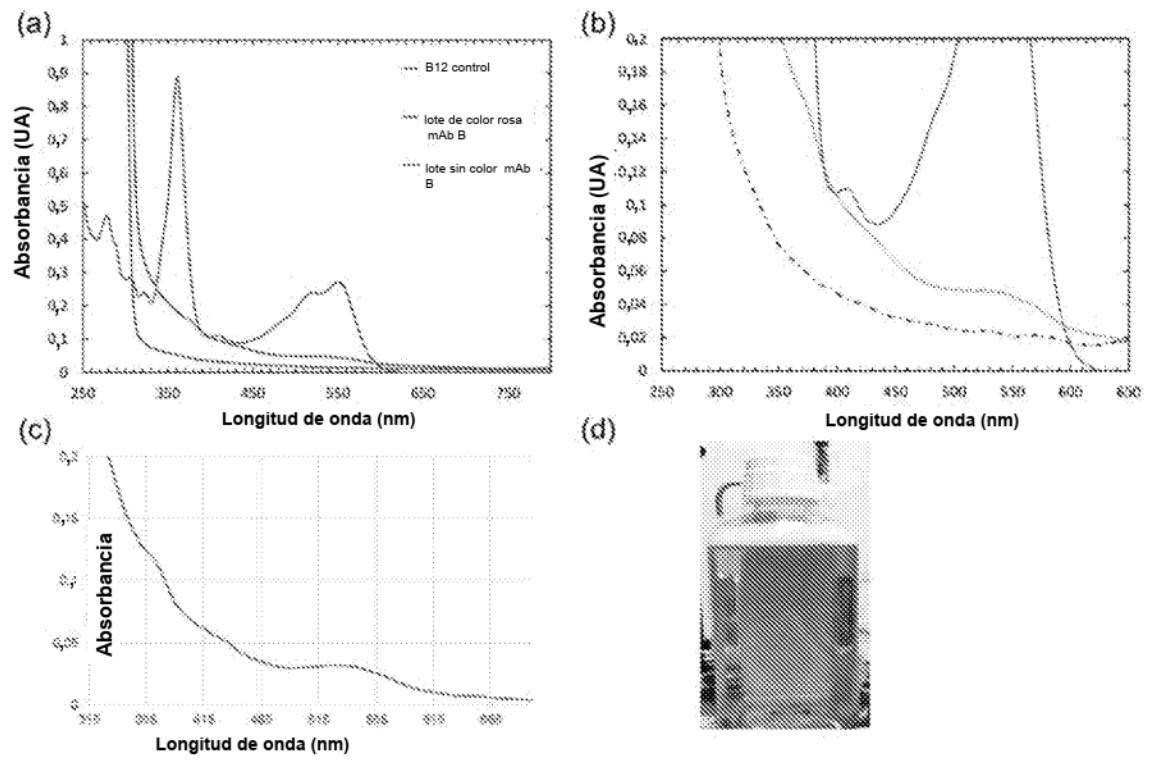
Molécula BPM	Condiciones. Rendimiento de la etapa de la Proteína A (%)	Pureza (%) Reducida No Reducida	Principal	Variantes de carga (%)		mAb intacto (%)				
				Ácido	Básico	Monómero				
						APM				
mAb4	CB centrifugado, 4 °C, 4 días	100	96,3	50,5	46,5	2,9	95,5	4,4	0,1	94,2
	Agregar H ₂ O ₂ 10 mM a CB centrifugado, 4 °C, 4 días	100	96,5	49,6	47,4	3,0	95,7	4,2	0,1	94,4
	H ₂ O ₂ 10 mM agregado al fluido de cultivo previo a la recolección, centrifugado, 4 °C, 4 días	100	95,7	50,3	46,4	3,2	95,5	4,4	0,1	92,6
	H ₂ O ₂ 10 mM agregado al fluido de cultivo previo a la recolección, centrifugado, 4C, 3 días; Lavado con N ₂ , TA durante 1 día	100	96,5	49,5	47,4	3,1	95,4	4,5	0,1	98,4
mAb2	CB centrifugado, lavado con N ₂ , TA, 1 día	ND	99,2	49,0	18,0	33,1	98,8	1,2	0	ND
	CB centrifugado, H ₂ O ₂ 3 mM, Lavado con N ₂ , TA, 1 día	ND	99,2	50,1	16,8	33,1	98,8	1,2	0	ND
	CB centrifugado, H ₂ O ₂ 5 mM, Lavado con N ₂ , TA, 1 día	ND	99,2	46,4	19,1	34,5	98,7	1,2	0,1	ND
	CB centrifugado, H ₂ O ₂ 10 mM, Lavado con N ₂ , TA, 1 día	ND	99,2	50,0	16,9	33,1	98,8	1,2	0	ND

*Para el mAb 4, los tratamientos fueron en las etapas de fluido de cultivo celular previo a la recolección o de volumen clarificado, el volumen clarificado resultante se sometió a cromatografía de proteína A y las etapas de inactivación y neutralización viral a bajo pH (PAVIB) usando condiciones de punto central del proceso. Los resultados analíticos provinieron de muestras de PAVIB. Para el **mAb 2**, las muestras de volumen clarificado tratadas con peróxido de hidrógeno y de control se purificaron mediante columnas de proteína A de alto rendimiento antes del análisis. ND, no determinado.

REIVINDICACIONES

1. Un método para impedir la reducción de enlaces disulfuro de anticuerpos, que comprende añadir peróxido de hidrógeno al volumen clarificado en la recolección.
2. Un método para inhibir la unión de la vitamina B₁₂ a anticuerpos durante la fabricación de cultivos celulares, que comprende
 - a) impedir la reducción de los enlaces disulfuro de anticuerpos añadiendo peróxido de hidrógeno al volumen clarificado en la recolección, y
 - b) inhibir la conversión de cianocobalamina (CN-Cbl) en el medio a hidroxocobalamina (HO-Cbl) evitando la exposición del medio de cultivo celular a la luz visible durante uno o más momentos seleccionados de la preparación del medio, almacenamiento del medio, producción de anticuerpos y recolección de anticuerpos.
3. El método de la reivindicación 2, en donde CN-Cbl se expone solo a luz roja (> 600 nm) durante la preparación del medio, el almacenamiento del medio y, opcionalmente, durante la producción de anticuerpos y la recolección de anticuerpos.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se selecciona entre anticuerpo monoclonal (mAb), anticuerpo humano (HuMAb), anticuerpo humanizado y anticuerpo quimérico.
5. Un proceso de cultivo celular para la producción de anticuerpos, que comprende:
 - a) cultivar células que producen el anticuerpo de interés,
 - b) recolectar el anticuerpo de interés del cultivo celular, y
 - c) añadir peróxido de hidrógeno al volumen clarificado en la recolección.
6. El proceso de cultivo celular de la reivindicación 5, en donde el proceso comprende además preparar y almacenar los medios de cultivo celular en condiciones de luz roja (>600 nm).
7. El proceso de cultivo celular de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6, en donde el proceso comprende además cultivar células que producen el anticuerpo de interés y recolectar el anticuerpo de interés del cultivo celular en condiciones de luz roja (>600 nm).
8. El uso de peróxido de hidrógeno en la recolección para inhibir la formación del color rosa durante la fabricación de anticuerpos.

FIG. 1



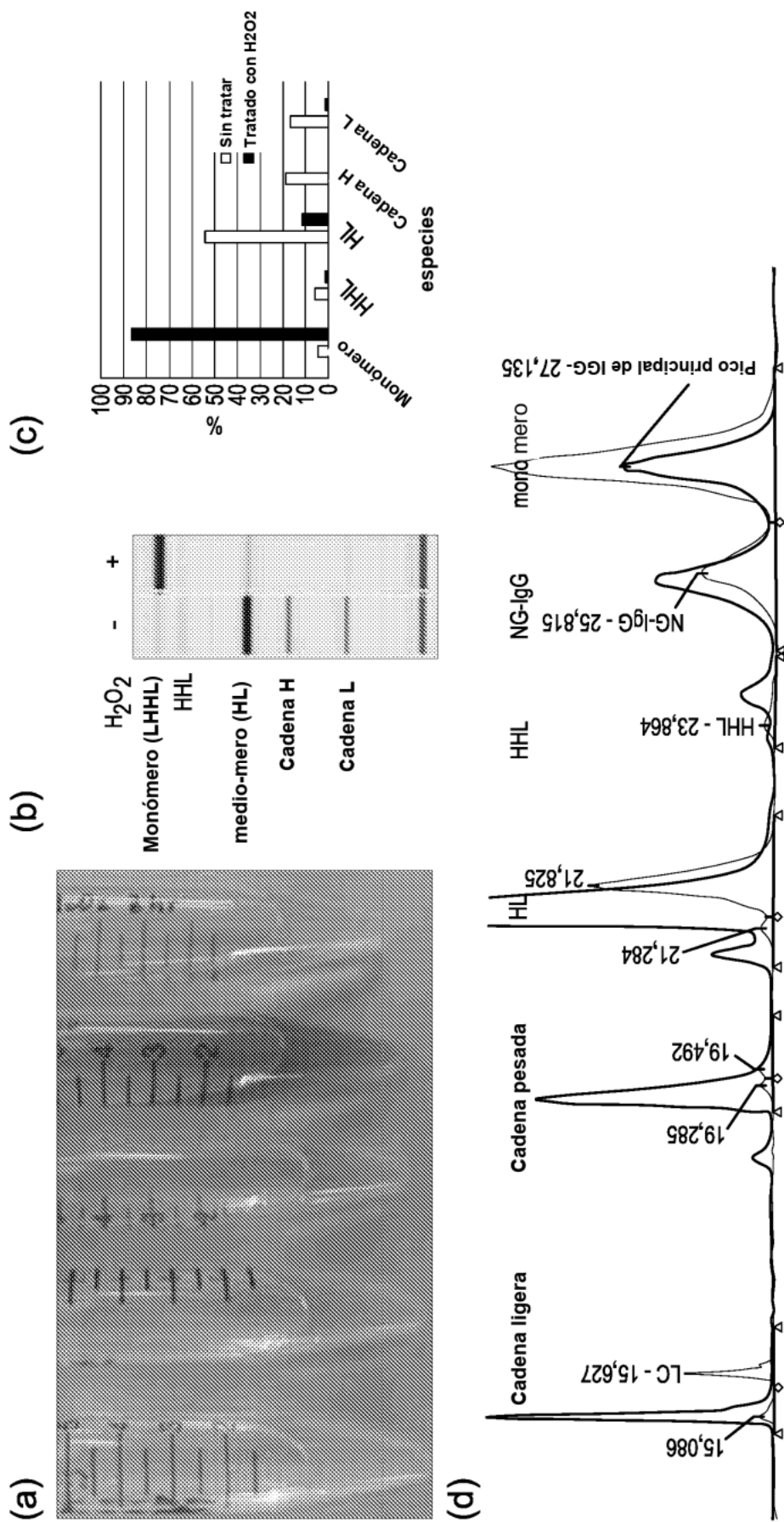
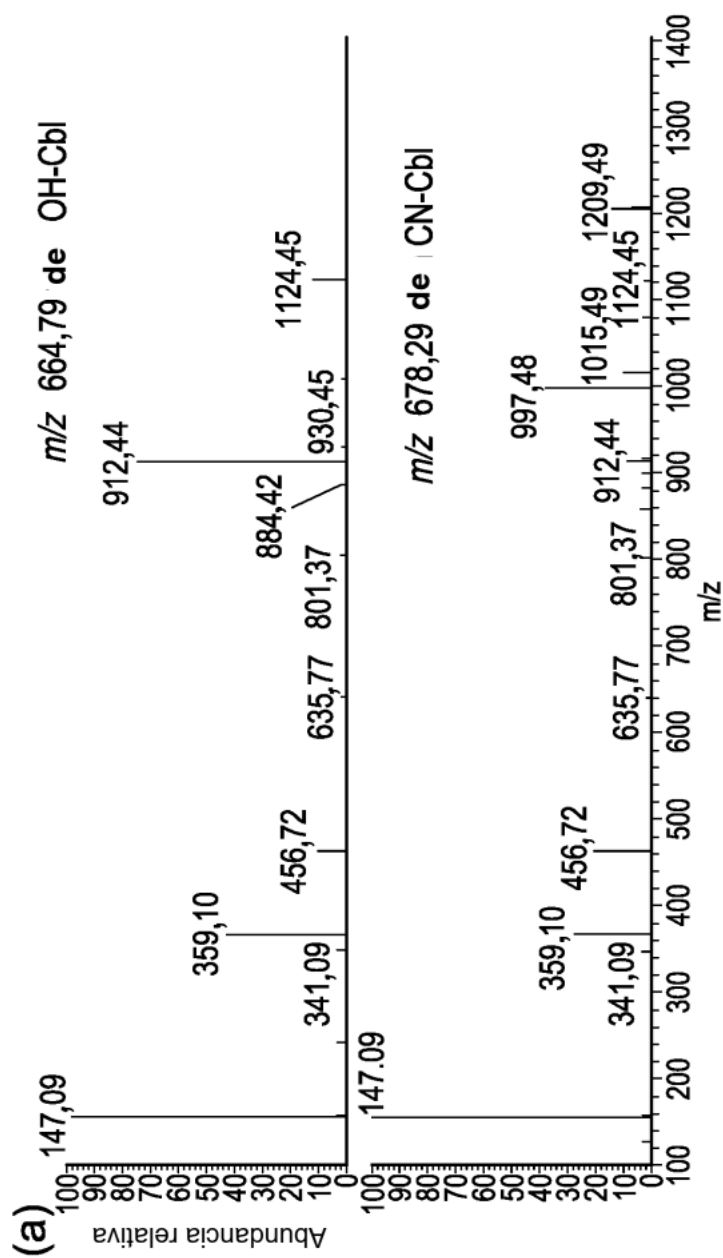
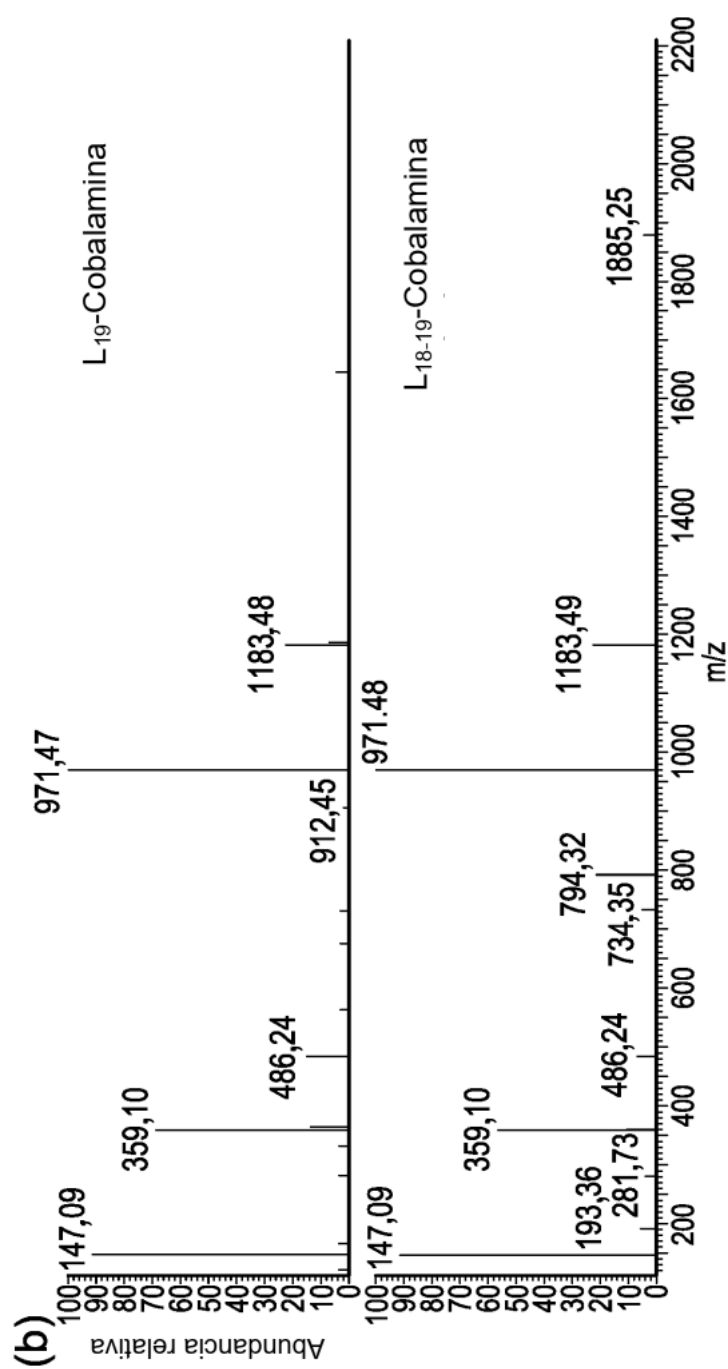


FIG. 2

**FIG. 3**

**FIG. 3**

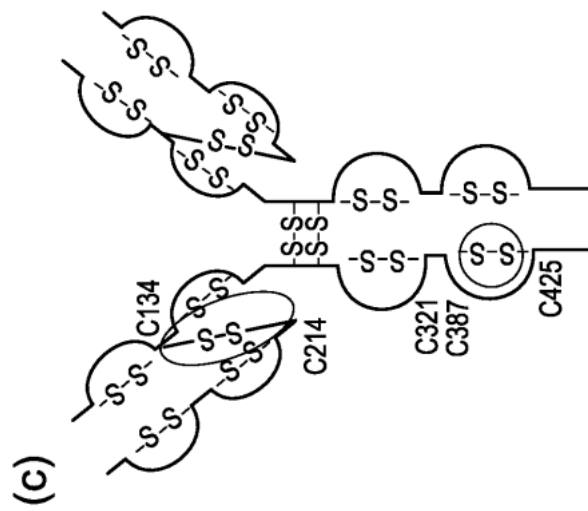


FIG. 3

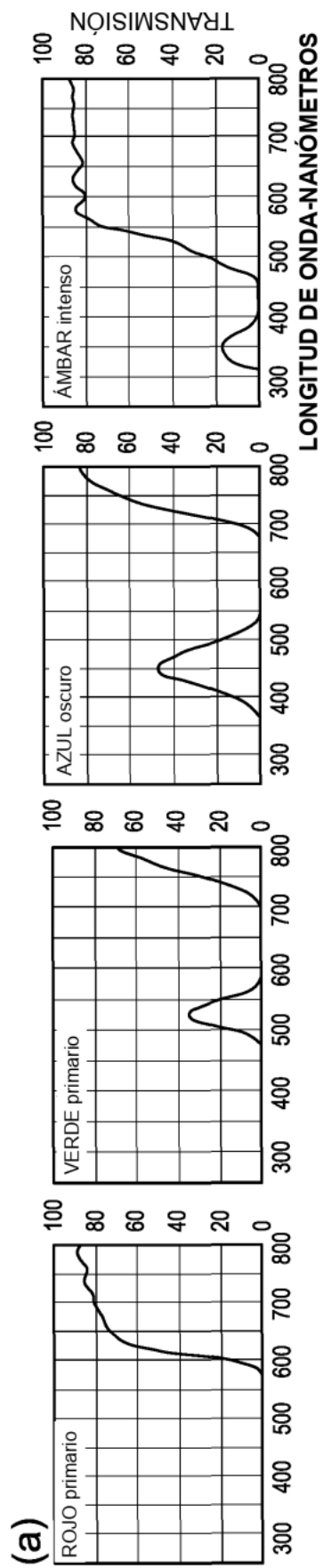


FIG. 4

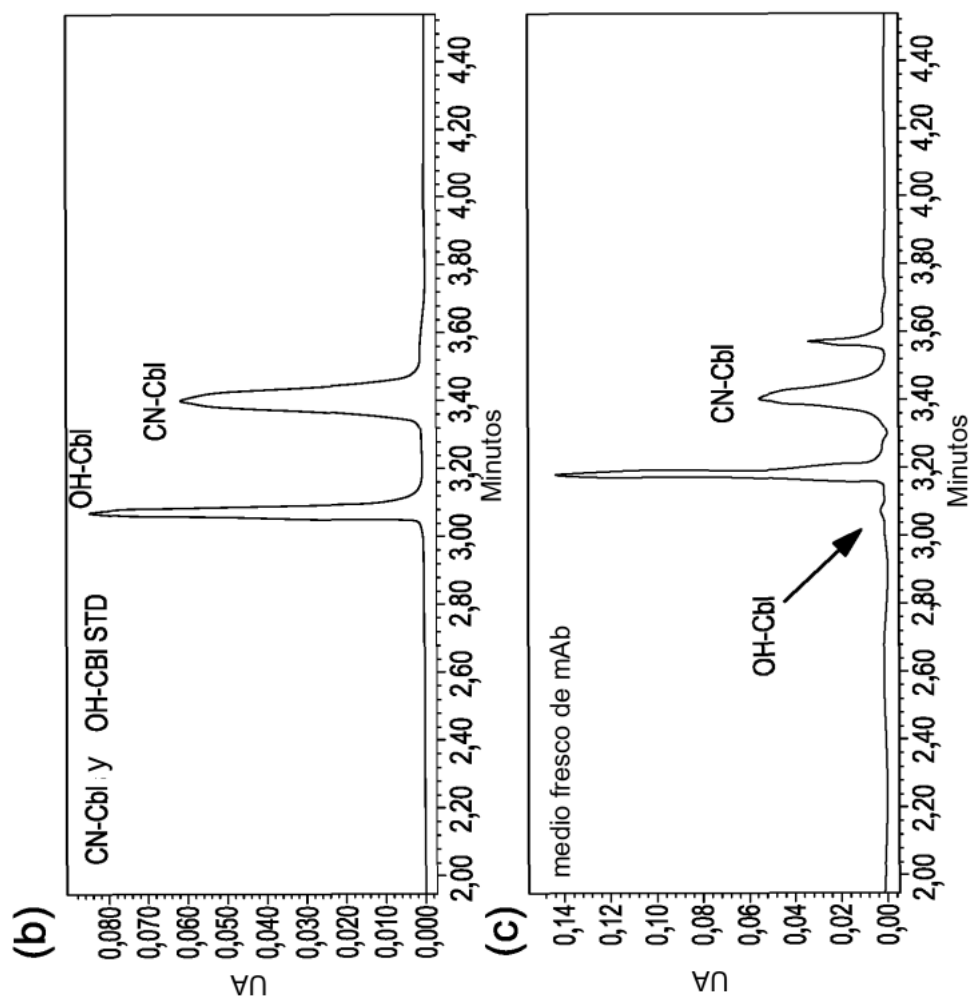
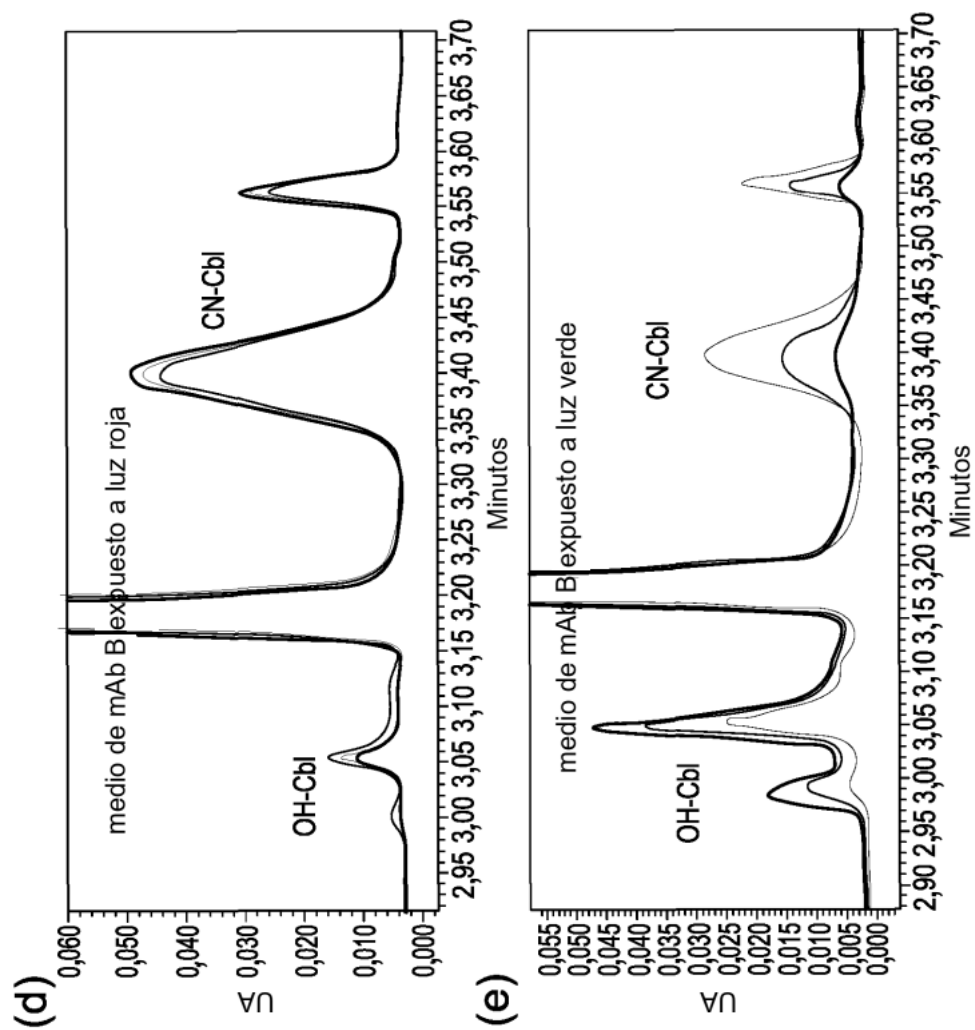


FIG. 4

**FIG. 4**

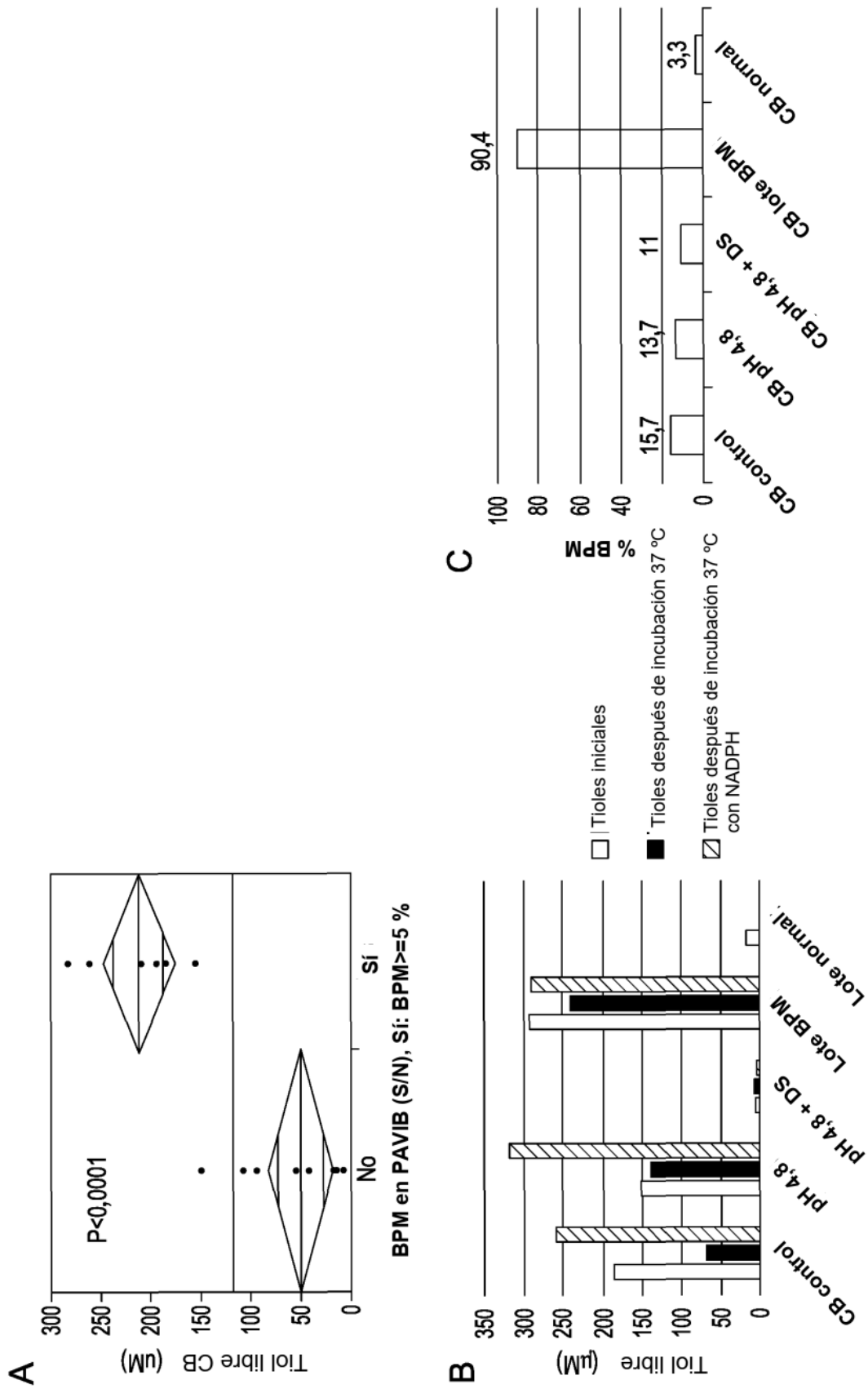


FIG. 5

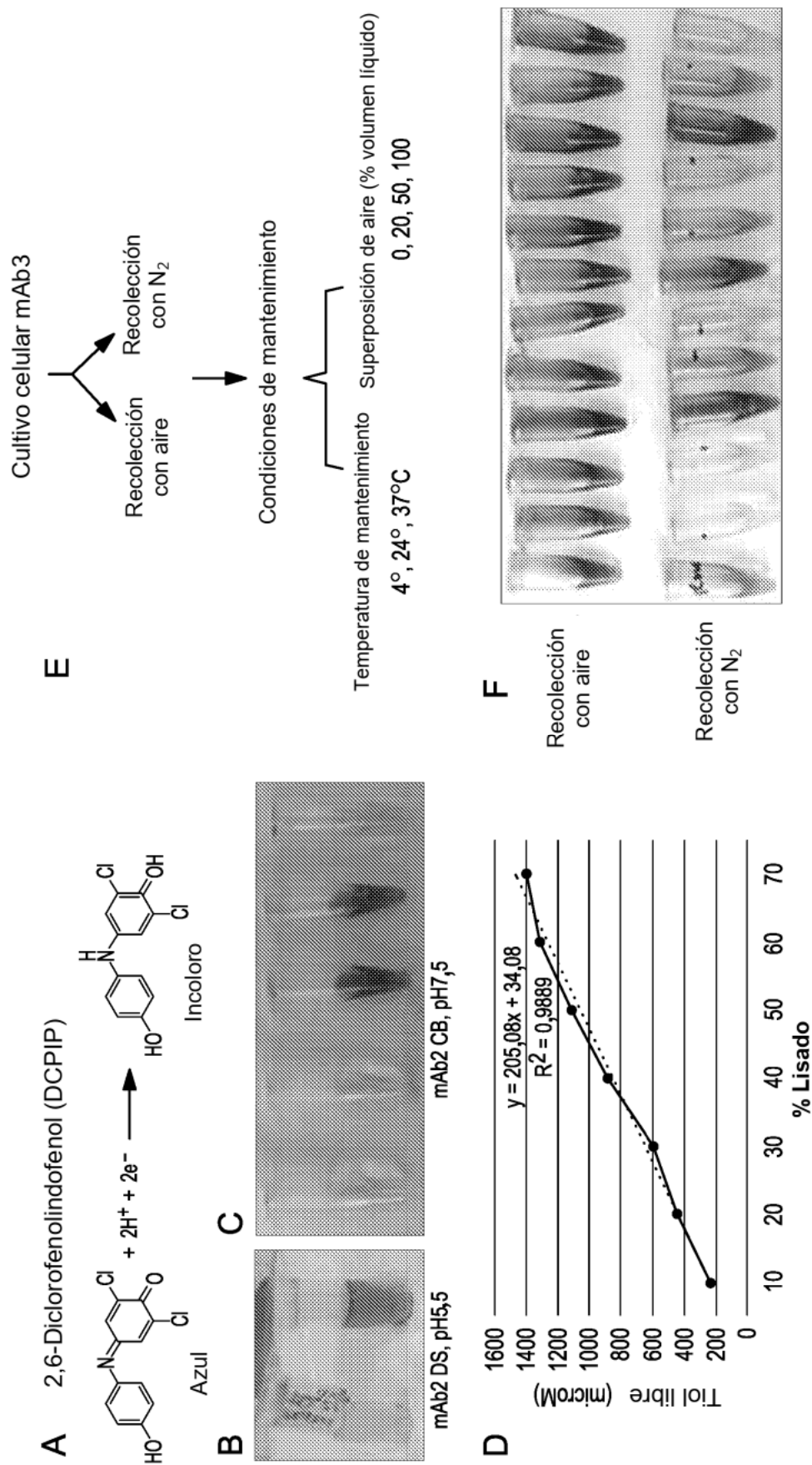


FIG. 6

FIG. 7

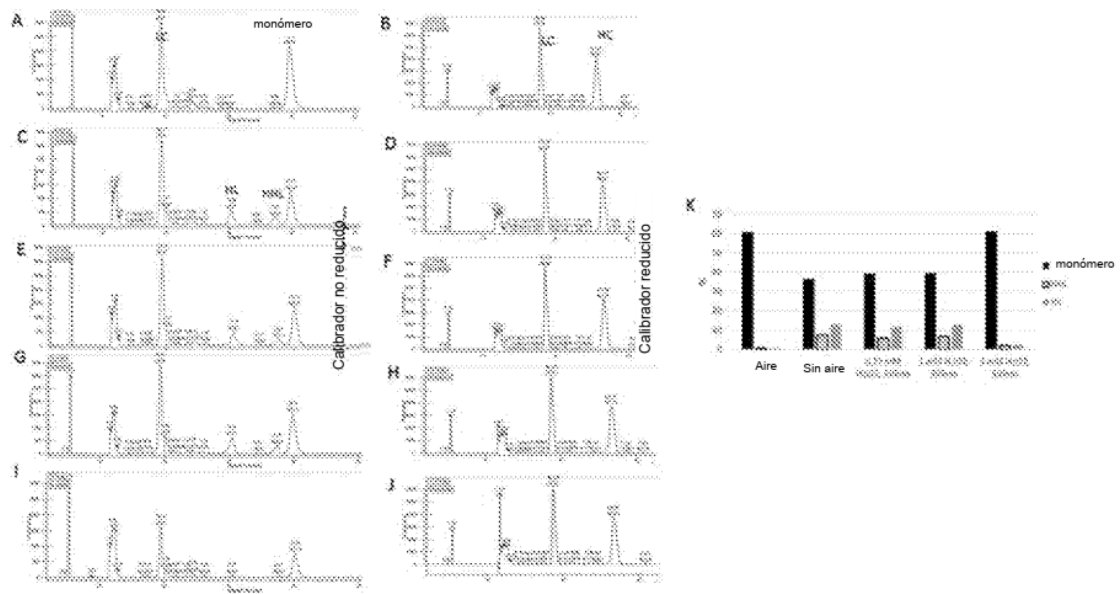


FIG. 8

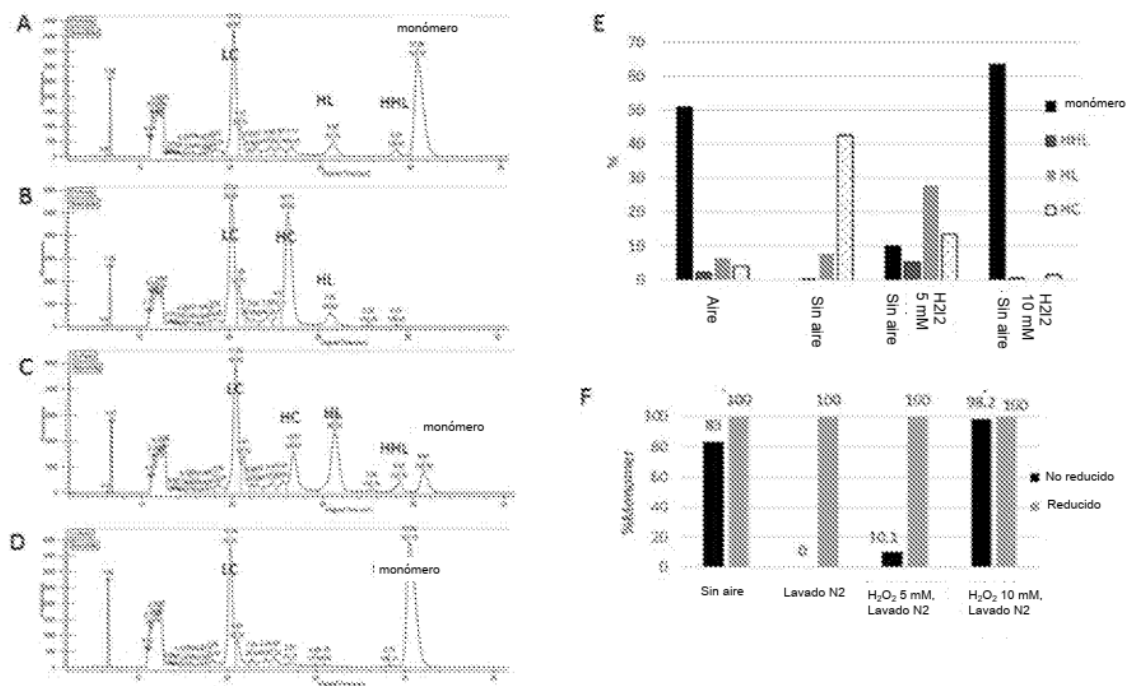


FIG. 9

