

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 964 640**

51 Int. Cl.:

C07K 1/113 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

B01D 15/36 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2016 PCT/US2016/046929**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017 WO17027861**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2016 E 16757780 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2023 EP 3334747**

54 Título: **Filtración en profundidad cargada de proteínas de unión al antígeno**

30 Prioridad:

13.08.2015 US 201562204831 P

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

08.04.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HOANG, HAI;
GONZALEZ, RAFAEL y
MA, JUNFEN**

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 2 964 640 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

Filtración en profundidad cargada de proteínas de unión al antígeno

5 REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA**LISTADO DE SECUENCIAS**

10 La presente solicitud contiene, como parte separada de la divulgación, un listado de secuencias en forma legible por ordenador (49841A_SeqListing.txt; 11.962 bytes bytes; creado el 12 de agosto de 2016);

CAMPO DE LA INVENCIÓN

15 La presente divulgación se refiere a métodos de producción de una formulación acuosa que comprende una proteína de unión al antígeno reoxidada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

20 Las proteínas terapéuticas de unión al antígeno, tales como los anticuerpos, se usan actualmente para tratar millones de pacientes en el mundo. Las moléculas de proteína de unión al antígeno se producen normalmente en sistemas de cultivo celular de mamífero y se recuperan usando una serie habitual de etapas de filtración y cromatografía (véase, por ejemplo, Liu et al., mAbs. 2(5): 480-499(2010)). Se han descrito métodos de aislamiento y purificación de anticuerpos de una muestra usando cromatografía de afinidad, por ejemplo, en los documentos de patente WO 2015/070068, US 2014/0010820. Se han descrito procesos continuos para la purificación de moléculas biológicas, por ejemplo, en el documento de patente US 2015/0133636. Los documentos de patente US 2010/0056759 y US 2013/0273607 están relacionados con métodos para la purificación de proteínas diana usando filtración en profundidad. El documento de patente WO 2014/100443 desvela métodos de preparación de inmunocombinados activos que comprenden una etapa de replegamiento y/o arrastre en columna. La estructura y estabilidad de las moléculas de proteína de unión al antígeno dependen en gran medida de los enlaces disulfuro que enlazan las dos cadenas pesadas y las cadenas pesadas y ligeras en cada molécula de proteína de unión al antígeno, sin embargo, durante el proceso de producción y purificación, uno o más enlaces disulfuro se puede reducir a grupos tiol libres. La reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios debilita la integridad estructural de la molécula de proteína de unión al antígeno y puede conducir a fragmentos de proteína de unión al antígeno (por ejemplo, cadena ligera, cadena pesada y sus combinaciones) y/o agregados de proteína de unión al antígeno, que alteran las funciones biológicas de las proteínas de unión al antígeno y, por consiguiente, su eficacia terapéutica. Aunque las moléculas reducidas siguen intactas durante el proceso de purificación por otras fuerzas (por ejemplo, enlaces iónicos, hidrófobos, de hidrógeno y van der Waals), se pueden fragmentar durante el almacenamiento o en el uso clínico. Por lo tanto, existe una necesidad de métodos de reoxidación de moléculas de proteína de unión al antígeno parcialmente reducidas para producir formulaciones farmacéuticas estables y eficaces.

40 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

45 La presente divulgación se refiere a métodos de producción de una formulación acuosa de una proteína de unión al antígeno (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, un anticuerpo o un pepticuerpo) o potenciación de la reoxidación de dicha proteína de unión al antígeno y a formulaciones que comprenden una proteína de unión al antígeno reoxidada preparada según estos métodos. En un aspecto, la presente invención se refiere a un método de producción de una formulación acuosa de una proteína de unión al antígeno que comprende (a) poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro en profundidad cargado, en donde el filtro en profundidad cargado comprende un ion metálico seleccionado del grupo que consiste en un ion sodio, ion calcio, ion magnesio, ion mercurio, ion cromo, ion cadmio, ion aluminio, ion potasio, ion plomo, ion arsénico, ion cobalto, ion hierro, ion manganeso, ion titanio, ion cinc, ion níquel, ion cobre y combinaciones de los mismos; y (b) medir una cantidad o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas en la disolución después de poner en contacto la disolución acuosa con el filtro en profundidad cargado, en donde el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas disminuye en al menos 20 % en comparación con el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas observado antes de la etapa de poner en contacto. En algunas realizaciones, el método comprende (1) una etapa de cromatografía en proteína A, (2) una etapa de inactivación vírica; (3) una etapa de filtración en profundidad; y (4) una etapa de incubación durante al menos cuatro horas. En una realización específica, el método comprende además (5) una etapa de cromatografía de intercambio catiónico; y una o más de (6) una etapa de cromatografía de interacción intolerante a la sal; (7) una etapa de filtración de virus; y (8) ultrafiltración y/o diafiltración. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de potenciación de la reoxidación de una proteína de unión al antígeno que comprende (a) poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro en profundidad cargado, en donde el filtro en profundidad cargado comprende un ion metálico seleccionado del grupo que consiste en un ion sodio, ion calcio, ion magnesio, ion mercurio, ion cromo, ion cadmio, ion aluminio, ion potasio, ion plomo, ion arsénico, ion cobalto, ion hierro, ion manganeso, ion titanio, ion cinc, ion níquel, ion cobre y combinaciones de los mismos; y (b) medir una cantidad o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al

antígeno reducidas, en donde la reoxidación de las moléculas de proteína de unión al antígeno aumenta al menos dos veces después de la etapa de poner en contacto. En algunas realizaciones de los aspectos mencionados anteriormente, la etapa (a) va precedida de someter la disolución de moléculas de proteína de unión al antígeno a cromatografía en proteína A. En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de inactivar uno o más virus en dicha disolución de moléculas de proteína de unión al antígeno. En algunas realizaciones, la puesta en contacto ocurre (a) a temperatura ambiente; o (b) a una temperatura de 2 grados a 8 grados Celsius. En algunas realizaciones, el método comprende además (a) una etapa de burbujear aire u oxígeno a través de la disolución de moléculas de proteína de unión al antígeno; y/o (b) poner en contacto la disolución de moléculas de proteína de unión al antígeno con un ion positivo seleccionado del grupo que consiste en sodio, calcio, magnesio, mercurio, molibdeno, cromo, cadmio, aluminio, potasio, cobalto, hierro, manganeso, titanio, cinc, níquel, cobre y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la disolución de moléculas de proteína de unión al antígeno se pone en contacto con más de un filtro en profundidad cargado. En algunas realizaciones, el filtro en profundidad cargado comprende una capa de tierra de diatomeas, opcionalmente que comprende además una capa de celulosa y una fase inorgánica, en donde la fase inorgánica comprende una resina de poliamina. En algunas realizaciones, el filtro en profundidad cargado comprende un ion cobre. En algunas realizaciones, la puesta en contacto ocurre a un caudal entre 250 l/m² y 850 l/m². En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno es un anticuerpo IgG, en donde el anticuerpo IgG es opcionalmente un anticuerpo IgG1 (opcionalmente un anticuerpo IgG1 con una cadena ligera kappa o un anticuerpo IgG1 con una cadena ligera lambda) o anticuerpo IgG2. En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno (a) se une al antígeno seleccionado del grupo que consiste en RANKL, factor de necrosis tumoral alfa, receptor del factor de crecimiento epidérmico, CD20, péptido relacionado con el gen calcitonina, esclerostina y glucoproteína de plaquetas IIb/IIIa; (b) se selecciona del grupo que consiste en abcximab, adalimumab, alemtuzumab, basiliximab, belimumab, bevacizumab, brentuximab vedotin, canakinumab, cetuximab, certolizumab pegol, daclizumab, denosumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, golimumab, ibritumomab tiuxetan, infliximab, ipilimumab, muromonab-CD3, natalizumab, nivolumab, ofatumumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, vedolizumab y un medicamento biológico similar de cualquiera de los anteriores; o (c) comprende una región de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-8. En algunas realizaciones, la cantidad de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas se mide usando electroforesis capilar no reducida con dodecilsulfato de sodio. En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de cromatografía de intercambio catiónico. En algunas realizaciones, el método comprende (1) una etapa de cromatografía en proteína A, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; (2) una etapa de inactivación vírica, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; y (3) una etapa de cromatografía de intercambio catiónico, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; comprendiendo opcionalmente además una o más de (4) una etapa de cromatografía de interacción intolerante a la sal, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; (5) una etapa de filtración de virus, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; y (5) ultrafiltración y/o diafiltración, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada. En algunas realizaciones, después del contacto con un filtro en profundidad cargado, el filtrado se incuba durante al menos aproximadamente 4 horas antes de someterse a una cromatografía en proteína A. En algunas realizaciones, la cantidad o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas se determina usando electroforesis capilar no reducida con dodecilsulfato de sodio (ECnr-SDS). En algunas realizaciones, la cantidad (tal como la cantidad total) o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas se mide usando electroforesis capilar no reducida con dodecilsulfato de sodio (ECnr-SDS). La cantidad total de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas después del contacto con el filtro en profundidad cargado en la etapa (a) puede ser del 10 % o menos de la cantidad total de moléculas de proteína de unión al antígeno y/o se puede disminuir en al menos tres veces en comparación con antes de la etapa (a).

En algunas realizaciones, la etapa (a) de los métodos descritos en el presente documento va precedida de someter la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno a cromatografía en proteína A. En algunas realizaciones, un método según la presente invención comprende además una etapa de inactivar uno o más virus en la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno y/o someter la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno a cromatografía de intercambio catiónico y/o burbujear aire u oxígeno en la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno. El método puede comprender además añadir un inhibidor de tiorredoxina o proteína similar a la tiorredoxina a la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.º 20090053786).

En algunas realizaciones, un método de la presente invención comprende (1) una etapa de cromatografía en proteína A, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; (2) una etapa de inactivación vírica, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; y (3) una etapa de cromatografía de intercambio catiónico, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; comprendiendo opcionalmente además una o más de (4) una etapa de cromatografía seleccionada opcionalmente de cromatografía de interacción intolerante a la sal, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de modo mixto, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; (5) una etapa de filtración de virus, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; y (5) ultrafiltración y/o diafiltración, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada. En algunas realizaciones en cualquiera de los métodos de la presente invención, después del contacto con un filtro en profundidad cargado, el filtrado se incuba durante al menos 4 horas, por ejemplo, al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 24 o más horas, antes de someterse a una cromatografía en proteína A.

En algunas realizaciones, el filtro en profundidad cargado comprende una capa de tierra de diatomeas. En algunas realizaciones, el filtro en profundidad cargado comprende además una capa de celulosa y/o una fase inorgánica, tal como una fase inorgánica que comprende una resina de poliamina. Como se reivindica en el presente documento, el filtro en profundidad cargado comprende un ion metálico seleccionado del grupo que consiste en sodio, calcio, magnesio, mercurio, cromo, aluminio, potasio, plomo, arsénico, cadmio, cobalto, hierro, manganeso, titanio, cinc, níquel, cobre, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el filtro en profundidad cargado puede comprender una de las siguientes combinaciones de iones positivos: 1) cobre y cobalto, 2) cobre y cadmio, 3) cobalto y cadmio, o 4) cobre, cobalto y cadmio. El ion positivo pueden ser un metal con un estado de oxidación 2⁺ o superior (tal como 3⁺ o 4⁺). En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con más de un filtro en profundidad cargado, tal como dos, tres, cuatro, cinco, o más filtros en profundidad cargados.

En algunas realizaciones, la disolución acuosa comprende una molécula de proteína de unión al antígeno que es un anticuerpo IgG, tal como un anticuerpo IgG1 o IgG2. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 con una cadena ligera kappa o un anticuerpo IgG1 con una cadena ligera lambda.

La proteína de unión al antígeno puede unirse a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, HER2, HER3, HER4, el receptor de EGF, LFA-1, Mol, p150, p95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina alfa v/beta 3, factor de crecimiento endotelial vascular, hormona de crecimiento, hormona estimulante tiroidea, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, factor liberador de hormona de crecimiento, hormona paratiroidea, hormona antimülleriana, proteína inflamatoria de macrófagos humana, eritropoyetina, NGF-beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas, aFGF, bFGF, factor de crecimiento epidérmico, TGF-alfa, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, IGF-I, IGF-II, des(1-3)-IGF-I, insulina, cadena A de insulina, cadena B de insulina, proinsulina, proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, factor VIII, factor tisular, factor de von Willebrand, proteína C, alfa-1-antitripsina, activadores del plasminógeno, urocinasa, activador tisular del plasminógeno, bombazina, trombina, trombopoyetina, M-CSF, GM-CSF, G-CSF, albúmina, IgE, receptor de flk2/flt3, receptor de obesidad, factor neurotrófico derivado de hueso, NT-3, NT-4, NT-5, NT-6, cadena A de relaxina, cadena B de relaxina, prorrelaxina, interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, IL-1 a IL-10, Antígeno vírico de la envoltura del sida, calcitonina, glucagón, factor natriurético auricular, tensioactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral-alfa, factor de necrosis tumoral-beta, encefalinasa, RANTES, péptido asociado a la gonadotropina de ratón, Dnasa, inhibina, activina; proteína A, proteína D, proteína morfogenética ósea, superóxido dismutasa, factor acelerador de la descomposición, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno se une al antígeno seleccionado del grupo que consiste en abciximab, adalimumab, alemtuzumab, basiliximab, belimumab, bevacizumab, brentuximab vedotin, canakinumab, cetuximab, certolizumab pegol, daclizumab, denosumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, golimumab, ibritumomab tiuxetan, infliximab, ipilimumab, muromonab-CD3, natalizumab, nivolumab, ofatumumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, vedolizumab y un medicamento biológico similar de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo, la formulación acuosa comprende rituximab o un anticuerpo que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de rituximab, por ejemplo, el anticuerpo puede comprender (a) una cadena ligera que contiene las tres CDR de cadena ligera de rituximab, (b) una cadena pesada que contiene las tres CDR de cadena pesada de rituximab, o (c) ambas. Por ejemplo, la formulación acuosa puede comprender infliximab o un anticuerpo que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de infliximab, por ejemplo, el anticuerpo puede comprender (a) una cadena ligera que contiene las tres CDR de cadena ligera de infliximab, (b) una cadena pesada que contiene las tres CDR de cadena pesada de infliximab, o (c) ambas. Por ejemplo, la formulación acuosa puede comprender ofatumumab o un anticuerpo que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de ofatumumab, por ejemplo, el anticuerpo puede comprender (a) una cadena ligera que contiene las tres CDR de cadena ligera de ofatumumab, (b) una cadena pesada que contiene las tres CDR de cadena pesada de ofatumumab, o (c) ambas.

Como se describe, pero no se reivindica en el presente documento, la divulgación proporciona una formulación que comprende una molécula de proteína de unión al antígeno reoxidada (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, una proteína de fusión, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un pepticuerpo) preparada usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

El resumen anterior no pretende definir cada aspecto de la invención, y otras características y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que incluye los dibujos. La presente divulgación pretende relacionarse como un documento unificado, y se debe entender que se contemplan todas las combinaciones de características descritas en el presente documento, aunque la combinación de características no se encuentren juntas en la misma frase, párrafo o sección de la presente divulgación. Además, la divulgación incluye, como un aspecto adicional, todas las realizaciones de la invención cuyo alcance sea más reducido de cualquier forma que las variaciones mencionadas específicamente anteriormente. Con respecto a los aspectos de la divulgación descrita o reivindicada con "un" o "una", se debe entender que estos términos significan "uno o más", a menos que el contexto requiera inequívocamente un significado más restringido. Con respecto a los elementos descritos como uno

o más dentro de un conjunto, se debe entender que se contemplan todas las combinaciones dentro del conjunto. Si los aspectos de la divulgación se describen como "que comprende" una característica, también se contemplan realizaciones "que consisten en" o "consisten esencialmente en" la característica. Características y variaciones adicionales de la divulgación serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la totalidad de la presente solicitud, y todas aquellas características están previstas como aspectos de la divulgación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico medido usando ECnr-SDS en el líquido de cultivo celular recogido (HCCF) y en la mezcla de proteína A.

La **Figura 2** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en (a) la mezcla de proteína A, antes de pasar a través del filtro en profundidad cargado, y (b) mezcla de inactivación vírica filtrada, después de pasar a través del filtro en profundidad cargado.

La **Figura 3A** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en una mezcla de proteína A filtrada en profundidad cargada durante hasta 8 días después de la filtración a temperatura ambiente o 2 °C a 8 °C. La **Figura 3B** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en una mezcla de proteína A no filtrada en profundidad cargada durante hasta 8 días después de la filtración a temperatura ambiente o 2 °C a 8 °C.

La **Figura 4A** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en HCCF sometido a filtración en profundidad cargada o sin filtración, seguida por cromatografía en proteína A. La **Figura 4B** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en HCCF sometido a filtración en profundidad cargada o sin filtración, seguida por cromatografía en proteína A, durante hasta 24 horas después de la filtración.

La **Figura 5A** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en una mezcla de proteína A como carga en comparación con el filtrado de filtro en profundidad. La **Figura 5B** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en una mezcla de inactivación vírica neutralizada (a) antes de la filtración (MIVn/Carga), (b) después de la filtración estéril en membrana y (c) después de la filtración en profundidad cargada, durante hasta 24 horas después de la filtración.

La **Figura 6** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en una mezcla de proteína A no filtrada en profundidad cargada, una mezcla MIVf filtrada en profundidad cargada, una mezcla MIVn oxigenada con aire y una mezcla MIVn sin aire, durante hasta 50 horas después de la filtración.

La **Figura 7A** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico después de la filtración en profundidad cargada a un caudal 250 l/m² (simulado) y 350 l/m² a 850 l/m² (experimental) durante hasta 24 horas después de la filtración. La **Figura 7B** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico después de la filtración en profundidad cargada a un caudal 150 l/m² a 450 l/m² durante hasta 24 horas después de la filtración.

La **Figura 8A** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico (prepico) y especies de alto peso molecular (HMW) antes (MIVn) y después de la cromatografía de intercambio catiónico (CEX PL) sin filtración en profundidad cargada. La **Figura 8B** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico (prepico) y especies de alto peso molecular (HMW) después de la filtración en profundidad cargada solo (MIVf) o filtración en profundidad cargada seguida por cromatografía de intercambio catiónico (CEX PL) inmediatamente después del procesamiento (t=0). La **Figura 8C** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico (prepico) y especies de alto peso molecular (HMW) después de la filtración en profundidad cargada solo (MIVf) o filtración en profundidad cargada seguida por cromatografía de intercambio catiónico (CEX PL) a las cuatro horas (t=4) después del procesamiento.

La **Figura 9A** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en muestras de MIVn añadidas con lavado de 0,5X a 4X de H₂SO₄ obtenido recirculando H₂SO₄ a través de un filtro en profundidad cargado durante 2 horas o MIVn sin adición. La **Figura 9B** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en muestras de MIVn añadidas con lavado con 0,5X a 4X de acetato (NaOAc) obtenido por recirculación de NaOAc a través de un filtro en profundidad cargado durante 2 horas, o MIVn sin adición.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que material de un filtro en profundidad cargado promueve la reoxidación de moléculas de unión al antígeno al menos tres veces más que un control de filtro en profundidad no cargado. El uso de filtración en profundidad cargada para promover la reoxidación es particularmente deseable para moléculas de unión al antígeno propensas a la reducción, tales como anticuerpos IgG1.

La presente divulgación proporciona métodos de producción de una formulación acuosa de una proteína de unión al antígeno (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, un anticuerpo o un pepticuerpo) o potenciamiento de la reoxidación de una proteína de unión al antígeno que comprende poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro en profundidad cargado en condiciones suficientes para reducir el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas. La divulgación también proporciona formulaciones que comprenden una proteína de unión al antígeno reoxidada (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, un anticuerpo o un pepticuerpo) preparada usando los métodos descritos en el presente documento. Los métodos que comprenden un filtro en profundidad cargado según la presente divulgación son más eficaces que otros métodos, tales como burbujeo con aire, enfriamiento y filtración en membrana estéril, para disminuir la cantidad de moléculas de proteína de unión al antígeno parcialmente reducidas en la disolución acuosa y así remediar los problemas de fragmentación y agregación que tienen los procesos de producción de proteínas de unión al antígeno y las formulaciones farmacéuticas resultantes.

Las siguientes definiciones pueden ser útiles para ayudar al profesional especializado en el entendimiento de la divulgación. A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en la presente divulgación deben tener los significados que son comúnmente entendidos por los expertos habituales en la técnica. Donde se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, al décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido está englobado dentro de la invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños se pueden incluir independientemente en los intervalos más pequeños, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Todas y cada una de las realizaciones descritas para los anticuerpos también se pueden usar para una proteína de unión al antígeno, tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc (por ejemplo, un pepticuerpo). En cambio, todas y cada una de las realizaciones descritas para proteínas de unión al antígeno también se aplican específicamente, en todos y cada uno de los casos, a anticuerpos, como se define en el presente documento.

El término "proteína de unión al antígeno" se refiere a una proteína o polipéptido que comprende una región de unión al antígeno o porción de unión al antígeno que tiene una fuerte afinidad por otra molécula a la que se une (antígeno). Las proteínas de unión al antígeno engloban anticuerpos, pepticuerpos, fragmentos de anticuerpo, derivados de anticuerpo, análogos de anticuerpo, proteínas de fusión (incluyendo fragmentos de una sola cadena variable (scFv) y scFv de cadena doble (divalentes)), y receptores de antígeno que incluyen receptores quiméricos para el antígeno (CAR).

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento según su significado habitual en las ciencias bioquímicas y biotecnológicas. Entre los anticuerpos dentro del significado del término como se usa en el presente documento están los aislados de fuentes biológicas, que incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos producidos por técnicas de ADN recombinante (también denominados a veces en el presente documento anticuerpos recombinantes), que incluyen los producidos por procesos que implican la activación de un gen endógeno y los que implican la expresión de una construcción de expresión exógena, que incluyen anticuerpos producidos en cultivo celular y los producidos en plantas y animales transgénicos, y anticuerpos producidos por métodos que implican síntesis química, que incluyen síntesis y semisíntesis de péptidos. También están dentro del alcance del término como se usa en el presente documento, excepto si se expone explícitamente lo contrario, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos multivalentes (por ejemplo, biespecíficos), entre otros. El anticuerpo IgG prototípico es una glucoproteína tetramérica comprendida de dos dímeros idénticos de cadena ligera-pesada unidos juntos por enlaces disulfuro. Existen dos tipos de cadenas ligeras, kappa y lambda de vertebrado. Cada cadena ligera comprende una región constante y una región variable. Las cadenas ligeras kappa y lambda se distinguen por sus secuencias de región constante. Existen cinco tipos de cadenas pesadas de vertebrado: alfa, delta, épsilon, gamma y mu. Cada cadena pesada comprende una región variable y una región constante, que normalmente comprenden tres dominios. Los cinco tipos de cadena pesada definen cinco clases de anticuerpos de vertebrado (isotipos): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Existen cuatro subclases de IgG humana, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y dos subclases de IgA, IgA1 e IgA2, por ejemplo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. Todos estos y otros no específicamente descritos anteriormente están incluidos en el significado del término "anticuerpo" o "anticuerpos", como se usa en el presente documento.

El término "filtro en profundidad cargado" o "filtro en profundidad" se refiere a un filtro que comprende a) matriz porosa (por ejemplo, matriz de 2 mm a 5 mm de espesor) que filtra una disolución basándose en la captura física dentro de los canales de matriz y/o la adsorción electrocinética, por ejemplo, debido a una carga en la matriz. Son adecuados una variedad de iones positivamente cargados, preferentemente iones metálicos, para su uso en dicho filtro. Los filtros en profundidad cargados están disponibles comercialmente de, por ejemplo, Cuno, Inc. (por ejemplo, serie ZETA PLUS S, serie ZETA PLUS SP, serie ZETA PLUS LP, serie ZETA PLUS CP, serie ZETA PLUS LP BC), EMD Millipore (por

ejemplo, D0HC, C0HC, F0HC, A1HC, B1HC, X0HC), Sartorius AG y Pall Corporation (por ejemplo, serie SEITZ P, serie SEITZ K, serie SUPRADUR, serie STAX, serie SUPRACAP, serie SUPRAPAK, serie SUPRADISC).

5 El término "región determinante de la complementariedad" o "CDR" se refiere a una región hipervariable de una cadena ligera o pesada de una proteína de unión al antígeno, normalmente de aproximadamente 9 a 12 aminoácidos de longitud, que confiere especificidad de unión a la proteína de unión al antígeno.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método de producción de una formulación acuosa de una proteína de unión al antígeno que comprende (a) poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro en profundidad cargado, en donde el filtro en profundidad cargado comprende un ion metálico seleccionado del grupo que consiste en un ion sodio, ion calcio, ion magnesio, ion mercurio, ion cromo, ion cadmio, ion aluminio, ion potasio, ion plomo, ion arsénico, ion cobalto, ion hierro, ion manganeso, ion titanio, ion cinc, ion níquel, ion cobre y combinaciones de los mismos; y (b) medir una cantidad o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas en la disolución después de poner en contacto la disolución acuosa con el filtro en profundidad cargado, en donde el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas disminuye en al menos 20 % en comparación con el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas observado antes de la etapa de poner en contacto.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de potenciamiento de la reoxidación de una proteína de unión al antígeno que comprende (a) poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro en profundidad cargado, en donde el filtro en profundidad cargado comprende un ion metálico seleccionado del grupo que consiste en un ion sodio, ion calcio, ion magnesio, ion mercurio, ion cromo, ion cadmio, ion aluminio, ion potasio, ion plomo, ion arsénico, ion cobalto, ion hierro, ion manganeso, ion titanio, ion cinc, ion níquel, ion cobre y combinaciones de los mismos; y (b) medir una cantidad o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, en donde la reoxidación de las moléculas de proteína de unión al antígeno aumenta al menos dos veces después de la etapa de poner en contacto.

30 La reoxidación de moléculas de proteína de unión al antígeno (tal como proteínas de unión al antígeno que comprenden una región Fc, proteínas de fusión, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o pepticuerpos) puede evidenciarse por una disminución en la cantidad (tal como la cantidad total) o cantidad relativa (por ejemplo, porcentaje) de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, en comparación con la cantidad (tal como la cantidad total) o cantidad relativa (por ejemplo, porcentaje) de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas observada antes de la etapa (a).

35 La disminución en las moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas se puede medir, por ejemplo, cuantificando la cantidad de fragmentos de proteína de unión al antígeno en la disolución acuosa antes y después de poner en contacto con el filtro en profundidad cargado para evaluar el grado de rotura de enlaces disulfuro intercatenarios. Un método de identificación de variantes de tamaño y cuantificación de la cantidad de moléculas de proteína de unión al antígeno parcialmente reducidas en una muestra comprende usar ECnr-SDS para determinar el porcentaje de especies pre-pico correspondientes a fragmentos de proteína de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Guo et al., Electrophoresis. 29(12):2550-6 (2008)). En general, se añade tampón no reductor a una muestra. Después de la incubación a alta temperatura, las muestras se inyectan en un capilar de sílice. La separación se realiza usando una electroforesis capilar en gel de dodecilsulfato de sodio (EC-SDS), y se realiza tensión y detección eficaces, por ejemplo, a 220 nm por absorbancia UV. Otros métodos para medir la pureza de una formulación acuosa de una proteína de unión al antígeno, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), diferencian entre agregados de proteína y monómeros, pero no distinguen entre moléculas de proteína de unión al antígeno parcialmente reducidas y reoxidadas en una muestra y, por lo tanto, no son suficiente para su uso en los métodos de la presente divulgación.

50 En una realización, la disminución de al menos 20 % se determina usando ECnr-SDS. En una realización, el aumento de al menos dos veces se determina usando ECnr-SDS.

55 El porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, un anticuerpo o un pepticuerpo) en la disolución acuosa que comprenden moléculas de proteína de unión al antígeno se puede disminuir al menos 20 %, al menos 21 %, al menos 22 %, al menos 23 %, al menos 24 %, al menos 25 %, al menos 26 %, al menos 27 %, al menos 28 %, al menos 29 %, al menos 30 %, al menos 31 %, al menos 32 %, al menos 33 %, al menos 34 %, al menos 35 %, al menos 36 %, al menos 37 %, al menos 38 %, al menos 39 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o más, después de poner en contacto la disolución acuosa con un filtro de profundidad cargado según la divulgación, en comparación con el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas o enlaces disulfuro reducidos observados antes de la etapa de poner en contacto. La cantidad total de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas después de poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro en profundidad cargado puede ser inferior a 10 %, por ejemplo, inferior a 9 %, inferior a 8 %, inferior a 7 %, inferior a 6 %, inferior a 5 %, inferior a 4 %, inferior a 3 %, inferior a 2 %, inferior a 1 %, de la cantidad total de moléculas de proteína de unión al antígeno en la disolución. Como otra medida, el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas en la disolución acuosa disminuye en al menos aproximadamente 2 veces, al menos

aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, o más, después de que la disolución acuosa se ponga en contacto con un filtro en profundidad cargado como se desvela, en comparación con antes de la etapa de puesta en contacto.

5 En algunas realizaciones, un filtro en profundidad cargado según la invención comprende una capa de tierra de diatomeas. La capa de tierra de diatomeas puede comprender un alto porcentaje (por ejemplo, aproximadamente 90 %) de sílice y/o se calcina para retirar materia orgánica. Opcionalmente, en algunas realizaciones, el filtro en profundidad cargado comprende además una capa de celulosa y/o una fase inorgánica en donde la fase inorgánica comprende una resina de poliamina, por ejemplo, poliamidoamina-epiclorhidrina (PAAE). En algunas realizaciones, el filtro de
10 profundidad cargado comprende un ion metálico seleccionado del grupo que consiste en sodio, calcio, magnesio, mercurio, cromo, cadmio, aluminio, potasio, plomo, arsénico, cobalto, hierro, manganeso, titanio, cinc, níquel, cobre y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en realizaciones, el filtro en profundidad cargado puede comprender una de las siguientes combinaciones de metales : 1) cobre y cobalto, 2) cobre y cadmio, 3) cobalto y cadmio, o 4) cobre, cobalto y cadmio. En metal (o uno o más o todos los metales en una combinación de metales) puede tener un estado
15 de oxidación 2⁺ o superior (tal como 3⁺ o 4⁺). Los filtros en profundidad cargados adecuados para su uso en los métodos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, los filtros MILLISTAK+ A1HC y X0HC (EMD Millipore, Billerica, MA) y el filtro ZETA PLUS (por ejemplo, ZETA PLUS 30SP) (Cuno, Inc., Meriden, CT). Uno o más de los metales (tales como el cobre) en el filtro en profundidad cargado pueden promover la reoxidación. Un filtro en profundidad cargado según la divulgación puede comprender uno o más de los siguientes medios: HC, CE, DE, IM, CR, ZA, SP, HP, ZC,
20 ELIS, LA, LP, EKS-P, EKM-P, SUPRA EK 1 P, KS 50 P, SUPRA 80 P, K 100 P, K 250 P, K 700 P y K 900 P.

Los protocolos para la filtración en profundidad cargada se conocen en la técnica y también están disponibles de los fabricantes de filtros en profundidad cargados comerciales. El filtro en profundidad cargado puede ser lavado con agua
25 desionizada y tampón de equilibrio antes de cargar la disolución acuosa que comprende las moléculas de proteína de unión al antígeno. La disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se puede cargar en el sistema de filtro en profundidad cargado para lograr a un caudal entre aproximadamente 10 l/m² y aproximadamente 1000 l/m², por ejemplo, entre aproximadamente 350 l/m² y aproximadamente 850 l/m², entre aproximadamente 250 l/m² y aproximadamente 450 l/m², entre aproximadamente 150 l/m² y aproximadamente 450 l/m², entre aproximadamente 50 l/m² y aproximadamente 800 l/m², o aproximadamente 150 l/m²,
30 aproximadamente 200 l/m², aproximadamente 250 l/m², aproximadamente 300 l/m², aproximadamente 350 l/m², aproximadamente 400 l/m², aproximadamente 450 l/m², aproximadamente 500 l/m², aproximadamente 550 l/m², aproximadamente 600 l/m², aproximadamente 650 l/m², aproximadamente 700 l/m², aproximadamente 750 l/m², aproximadamente 800 l/m², aproximadamente 850 l/m², o aproximadamente 900 l/m². En algunas realizaciones, la puesta en contacto ocurre a un caudal entre 250 l/m² y 850 l/m².
35 ocurre a un caudal entre 250 l/m². El caudal de la disolución acuosa a través del sistema de filtro en profundidad cargado puede ser inferior a aproximadamente 500 l/m²/h, por ejemplo, inferior a aproximadamente 400 l/m²/h, inferior a aproximadamente 300 l/m²/h, inferior a aproximadamente 200 l/m²/h, inferior a aproximadamente 100 l/m²/h, o inferior a aproximadamente 50 l/m², opcionalmente a una presión inferior o igual a aproximadamente 345 kPa (50 psi), por ejemplo, aproximadamente 345 kPa (50 psi), inferior a aproximadamente 345 kPa (50 psi), inferior a aproximadamente 276 kPa (40 psi), inferior a aproximadamente 207 kPa (30 psi), inferior a aproximadamente 138 kPa (20 psi), o inferior a aproximadamente 69 kPa (10 psi). La cantidad total de la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se puede filtrar a través del sistema de filtro en profundidad cargado durante aproximadamente 5 horas o menos, por ejemplo, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4,5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2,5 horas,
45 aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 30 minutos, o menos. Por ejemplo, la cantidad total de la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se pueden filtrar a través del sistema de filtro en profundidad cargado durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3 horas, tal como aproximadamente 1 a 2 horas, o aproximadamente 1,5 a 2 horas.
50

En algunas realizaciones, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se pone en contacto con un filtro en profundidad cargado a temperatura ambiente, es decir, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 26 °C, por ejemplo, a aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C, aproximadamente 25 °C, o aproximadamente 26 °C. En algunas
55 realizaciones, la etapa de puesta en contacto ocurre a una temperatura entre 2 °C y 8 °C, por ejemplo, a aproximadamente 2 °C, aproximadamente 3 °C, aproximadamente 4 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 6 °C, aproximadamente 7 °C, o aproximadamente 8 °C.

Como se describe, pero no se reivindica en el presente documento, un filtro en profundidad cargado o material de un
60 filtro en profundidad cargado (tal como la capa de tierra de diatomeas) se puede probar para la capacidad de reoxidar una proteína de unión al antígeno usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. La proteína de unión al antígeno se puede incubar con un filtro en profundidad cargado o material de un filtro en profundidad cargado (tal como la capa de tierra de diatomeas) y entonces se pueden tomar muestras de la proteína de unión al antígeno en diversos momentos de tiempo (tal como cada 30 minutos durante 1 o 2 horas) para medir la cantidad de
65 proteína de unión al antígeno reducida. El material de un filtro en profundidad cargado (tal como la capa de tierra de diatomeas) se puede disponer en una columna y la proteína de unión al antígeno se puede cargar sobre la columna y

empujar a través de la columna. La cantidad de proteína de unión al antígeno reducida se puede medir para muestras recogidas de la columna.

5 En algunas realizaciones, un método según la invención comprende además someter la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno a cromatografía en proteína A que precede a la etapa (a). Las técnicas de cromatografía en proteína A se conocen en la técnica, y el proceso se usa rutinariamente para retirar contaminantes, tales como proteína de célula hospedadora, ADN y virus de una disolución que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con una región Fc basada en la afinidad de la proteína A por la región Fc y/o Fab de inmunoglobulinas. Se puede usar un tampón de carga neutro o básico (tal como pH 7 a 8) para unir la proteína de unión al antígeno a la resina de proteína A. Se puede usar pH bajo para eluir la proteína de unión al antígeno de la resina de proteína A, tal como un pH entre 3 y 5, tal como 3 a 4, o 4 a 5. En una realización, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se somete a cromatografía en proteína A antes ponerse en contacto con un filtro en profundidad cargado. En algunas realizaciones, después de la filtración en profundidad, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se incuba durante al menos aproximadamente cuatro horas, por ejemplo, al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 24, 32, 48 o más horas para promover la reoxidación antes de someterse a una cromatografía en proteína A. Por ejemplo, después de la filtración en profundidad, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se incuba durante entre 2 y 32 horas (tal como entre 12 a 24 horas, 24 a 48 horas, o 24 a 32 horas) antes de someterse a una cromatografía en proteína A.

20 En algunas realizaciones, un método de la invención comprende además una etapa de inactivar uno o más virus presentes en la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno. En una realización, el método comprende inactivar uno o más virus en una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno antes poner en contacto la disolución con un filtro en profundidad cargado. En otra realización, un método comprende inactivar uno o más virus en una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno después de poner en contacto la disolución con un filtro en profundidad cargado. En algunas realizaciones, una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno de virus inactivado se incuba durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 24, 32, 48 o más horas después de la filtración en profundidad cargada para promover la reoxidación. Los métodos de inactivación de virus se conocen en la técnica y, en general, comprenden reducir el pH de una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno, por ejemplo, a un pH entre 3,0 y 4,0, durante un periodo de tiempo prolongado, tal como aproximadamente una hora. En algunas realizaciones, un método según la divulgación comprende someter una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno a cromatografía en proteína A y una etapa de inactivación vírica, por ejemplo, cromatografía en proteína A, seguida inactivación vírica, antes de ponerse en contacto con un filtro en profundidad cargado. En otra realización, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se somete a cromatografía en proteína A y una etapa de activación vírica, por ejemplo, cromatografía en proteína A seguida por inactivación vírica, después de entrar en contacto con un filtro en profundidad cargado. En otra realización más, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se somete a cromatografía en proteína A, seguida por entrar en contacto con un filtro en profundidad cargado, seguida por inactivación vírica. En una realización, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se somete a cromatografía en proteína A, seguida por inactivación vírica, y entonces entra en contacto con un filtro en profundidad cargado, seguida por un tiempo de mantenimiento de la incubación de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 o más horas.

45 En algunas realizaciones, un método de la invención comprende además someter una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno a cromatografía de intercambio catiónico (CEX). Las técnicas de cromatografía CEX se conocen en la técnica, y el proceso se usa rutinariamente para separar anticuerpos, tales como anticuerpos IgG1 y IgG2 humanos o humanizados basándose en la afinidad de los anticuerpos por la resina de CEX negativamente cargada. La disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se puede someter a cromatografía CEX antes de entrar en contacto con un filtro en profundidad cargado. Alternativamente, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno puede entrar primero en contacto con un filtro en profundidad cargado y luego se somete a cromatografía CEX. Una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se puede someter a cromatografía en proteína A y una etapa de inactivación vírica y entonces entra en contacto con un filtro en profundidad cargado, opcionalmente con un tiempo de mantenimiento de la incubación de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 o más horas, seguida por filtración en profundidad cargada, antes de someterse a una cromatografía CEX. Una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se puede someter a cromatografía en proteína A, seguida por cromatografía CEX antes de entrar en contacto con un filtro en profundidad cargado.

60 En algunas realizaciones, un método según la invención comprende poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro en profundidad cargado. En algunas realizaciones, una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se pone en contacto con más de un filtro en profundidad cargado, por ejemplo, dos, tres, cuatro, o más filtros en profundidad cargados, por ejemplo, en serie o en paralelo o separados por otras etapas de proceso, tales como centrifugación, microfiltración, ultrafiltración, diafiltración, cromatografía en proteína A, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio

aniónico y/o inactivación/filtración vírica. En algunas realizaciones, una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno (por ejemplo, HCCF) entra opcionalmente en contacto con un filtro en profundidad cargado y entonces se somete a una etapa de cromatografía en proteína A, opcionalmente seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada, luego se somete a una etapa de inactivación vírica, opcionalmente seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada, luego se somete a una etapa de cromatografía de intercambio catiónico, opcionalmente seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada, luego se somete a otra etapa de cromatografía, seleccionada opcionalmente de cromatografía de interacción intolerante a la sal con ligando de amina primaria (STIC PA), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y cromatografía de modo mixto (MMC), opcionalmente seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada, luego se somete a una etapa de filtración de virus, opcionalmente seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada, luego se somete a una etapa de ultra/diafiltración, opcionalmente seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada. Además, opcionalmente, existe un tiempo de mantenimiento de la incubación de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 o más horas, seguida por cualquier etapa de filtración en profundidad cargada.

El efecto de potenciar la reoxidación de las moléculas de proteína de unión al antígeno puede seguir durante un periodo de tiempo prolongado después de que la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno se ponga en contacto con el filtro en profundidad cargado. El porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas puede seguir reduciéndose durante al menos una hora, por ejemplo, al menos dos horas, al menos tres horas, al menos cuatro horas, al menos cinco horas, o más, después de la filtración en profundidad cargada, alcanzando el tiempo una cantidad en estado estacionario de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas que es mínima, por ejemplo, después de aproximadamente 4 a aproximadamente 24 horas. El porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas en la disolución acuosa puede seguir reduciéndose a una temperatura entre aproximadamente 2 °C y temperatura ambiente. A diferencia, la cantidad de moléculas de proteína de unión al antígeno parcialmente reducidas en una disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno continúa aumentando si la disolución no entra en contacto con un filtro en profundidad cargado (véase Ejemplos).

En una realización, la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno se pone en contacto además con una composición que comprende tierra de diatomeas. Opcionalmente, la composición comprende tierra de diatomeas que se lava con ácido y/o contiene aproximadamente 90 % de dióxido de silicio. Los ejemplos de composiciones que comprenden tierra de diatomeas incluyen, pero no se limitan a, Celite 545 Filter Aid (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y HYFLO SUPERCEL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

En algunas realizaciones, la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno se pone en contacto además con un ion positivo en disolución, por ejemplo, un ion metálico, tal como sodio, calcio, magnesio, mercurio, molibdeno, cromo, cadmio, aluminio, potasio, cobalto, hierro, manganeso, titanio, cinc, níquel, cobre o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno se pone en contacto además con una de las siguientes combinaciones de metales: 1) cobre y cobalto, 2) cobre y cadmio, 3) cobalto y cadmio, o 4) cobre, cobalto y cadmio. El metal (o uno o más o todos los metales en una combinación de metales) puede tener un estado de oxidación 2⁺ o superior (tal como 3⁺ o 4⁺). El ion positivo, por ejemplo, un ion metálico disuelto, se pueden añadir a una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno antes o durante la etapa de poner en contacto la disolución acuosa con un filtro en profundidad cargado. Por ejemplo, se añade opcionalmente cobre en HCCF. Opcionalmente, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se burbujea con aire u oxígeno, es decir, antes, durante y/o después de ponerse en contacto la disolución acuosa con un filtro en profundidad cargado. También opcionalmente, se aumenta el nivel de oxígeno disuelto en el biorreactor, el recipiente de HCCF se precarga con tampón saturado de oxígeno antes de la recogida de HCCF, y/o aumenta la aireación en el biorreactor y/o recipiente de HCCF.

Como se describen pero no se reivindica en el presente documento, un método de producción de una formulación acuosa de una proteína de unión al antígeno (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, una proteína de fusión, un anticuerpo o un peptidocuerpo) o de potenciación de la reoxidación de dicha proteína de unión al antígeno comprende (a) poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con al menos un extraíble de un filtro en profundidad cargado en condiciones suficientes para lograr al menos una disminución del 20 %, opcionalmente una disminución del 30 % o 40 %, en el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, en comparación con el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas observado antes de la etapa (a); y (b) medir la cantidad (tal como la cantidad total) o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas. Un extraíble de un filtro en profundidad cargado puede ser, por ejemplo, un ion positivo descrito en el presente documento u otro componente presente en el filtro en profundidad cargado. Opcionalmente, el extraíble se retira de un filtro en profundidad cargado poniendo en contacto el filtro en profundidad cargado con una disolución ácida, por ejemplo, H₂SO₄. Por ejemplo, la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno se puede poner en contacto con al menos un extraíble de un filtro en profundidad cargado en lugar de entrar en contacto con un filtro en profundidad cargado. Alternativamente, la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno se puede poner en contacto con al menos un extraíble de un filtro en profundidad cargado, además de entrar en contacto con un filtro en profundidad cargado.

Las proteínas de unión al antígeno según la presente divulgación pueden comprender polipéptidos de cadena pesada y ligera que tienen la misma secuencia de aminoácidos como las que se encuentran y constituyen los anticuerpos

naturales, y/o los que son producidos por tecnologías de hibridoma, por activación de un gen endógeno (por recombinación homóloga o no homóloga, por ejemplo), por expresión de un gen exógeno bajo el control de una región de control de la transcripción endógena, por expresión de una construcción de expresión exógena, por semisíntesis y por síntesis *de novo*, por nombrar algunas técnicas empleadas comúnmente para producir proteínas de unión al antígeno según la divulgación.

Entre estas proteínas de unión al antígeno se incluyen las que, en su totalidad o en parte, tienen una secuencia de aminoácidos *de novo*, las que tiene una secuencia de aminoácidos que se corresponde de alguna forma con la de un anticuerpo natural, pero se diferencia de él en otras formas, las que tienen las mismas secuencias de aminoácidos pero diferentes de un homólogo natural o secuencia relacionada con él, pero se diferencian del homólogo en una o más modificaciones postraduccionales, y las comprendidas en parte de cualquiera de las anteriores (en parte o en su totalidad) fusionadas con una o más regiones de polipéptido que pueden ser de o derivar de o relacionarse con un segundo polipéptido de proteína de unión al antígeno diferente, y pueden ser de o derivar de cualquier otro polipéptido o proteína, si existe de forma natural, que se parezca pero diferente de él, que tiene una secuencia de aminoácidos semi-*de novo* y/o una secuencia de *de novo*, entre otros, en tanto que la estructura de proteína de unión al antígeno comprenda un enlace disulfuro que sea capaz de ser reducido. Dichos polipéptidos se denominan, en general, en el presente documento polipéptidos de fusión y/o proteínas de fusión. Por ejemplo, las proteínas de unión al antígeno según la divulgación son proteínas que comprenden una o más CDR y/o regiones derivadas de CDR y/o relacionadas con CDR de una proteína de unión al antígeno que existe de forma natural o comercialmente disponible.

En algunos ejemplos, las proteínas de unión al antígeno, como se usan en el presente documento, incluyen "pepticuerpos" que comprenden uno o más péptidos específicos de antígeno (por ejemplo, dos o tres péptidos en serie) fusionados con una región Fc de un anticuerpo. Véase, por ejemplo, Shimamoto, MAbs. 4(5):586-91 (2012); publicación de patente de EE. UU. 2014/0024111, publicada el 23 de enero de 2014.

Además, entre las proteínas de unión al antígeno según la divulgación están las proteínas modificadas según todo lo anterior. Entre dichas proteínas modificadas se incluyen las proteínas modificadas químicamente por un enlace no covalente, enlace covalente, o tanto un enlace covalente como no covalente. También están incluidas todas las anteriores que comprenden además una o más modificaciones traduccionales que se pueden hacer por sistemas de modificación celular o modificaciones introducidas *ex vivo* por métodos enzimáticos y/o químicos, o introducidas de otras formas.

Con respecto a las proteínas de unión al antígeno según lo anterior, véase, por ejemplo, Protein Engineering: Principles and Practice, Jeffrey L. Cleland y Charles S. Craik, eds. Wiley-Liss, Inc., New York (1996), particularmente en él Kelley, Robert F., "Engineering Therapeutic Antibodies", Capítulo 15, pp. 399-434 y Hollinger, P. & Hudson, P., "Engineered antibody fragments and the rise of single domains", Nature Biotechnology, septiembre de 2005, 1126-1136, particularmente en partes referentes a la estructura e ingeniería de proteínas de unión al antígeno, particularmente anticuerpos biofarmacéuticos y proteínas farmacéuticas relacionadas con anticuerpos según la divulgación.

La proteína de unión al antígeno puede pertenecer a una clase particularmente sensible a la reducción. En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno es un anticuerpo IgG1 o IgG2. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una cadena ligera lambda. En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en IgG1λ, IgG1κ, IgG2λ e IgG2κ.

En cuanto a todo lo anterior, se prefieren particularmente proteínas de unión al antígeno humanas, humanizadas, y otras, tales como anticuerpos humanos y humanizados, que no generen respuestas inmunitarias significativamente perjudiciales cuando se administran a un humano. También se prefieren proteínas de unión al antígeno según todo lo anterior que similarmente no provocan una respuesta inmunitaria significativamente perjudicial cuando se administran a seres no humanos, por ejemplo, mamíferos domesticados.

El anticuerpo se puede seleccionar del grupo que consiste en proteínas que se unen específicamente a una o más proteínas CD, proteínas de la familia de receptores de HER, moléculas de adhesión a células, factores de crecimiento, factores de crecimiento nervioso, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento transformante (TGF), factores de crecimiento similar a la insulina, factores osteoinductivos, insulina y proteínas relacionadas con la insulina, coagulación y proteínas relacionadas con la coagulación, factores estimulantes de colonias (CSF), otras proteínas de la sangre y séricas, antígenos de grupo sanguíneo; receptores, proteínas asociadas a receptores, receptores de la hormona de crecimiento, receptores de linfocitos T; factores neurotróficos, neurotrofinas, relaxinas, interferones, interleucinas, antígenos víricos, lipoproteínas, integrinas, factores reumatoides, inmunotoxinas, proteínas de la membrana superficial, proteínas de transporte, receptores de recirculación, adresinas, proteínas reguladoras e inmunoadhesinas.

Por ejemplo, una proteína de unión al antígeno según la divulgación puede unirse a uno de más de los siguientes, solos o en cualquier combinación: (i) proteínas CD que incluyen, pero no se limitan a, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; (ii) proteínas de la familia de receptores de HER, que incluyen, por ejemplo, HER2, HER3, HER4 y el receptor de EGF; (iii) moléculas de adhesión a células, por ejemplo, LFA-1, Mol, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina alfa v/beta 3; (iv) factores de crecimiento, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, factor de crecimiento

5 endotelial vascular ("VEGF"); hormona de crecimiento, hormona estimulante tiroidea, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, factor liberador de hormona de crecimiento, hormona paratiroidea, hormona antimülleriana, proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1-alfa), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos, que incluye, por ejemplo, aFGF y bFGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento transformante (TGF), que incluyen, entre otros, TGF-alfa y TGF-beta, que incluye TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4 o TGF-beta5, factores de crecimiento similar a la insulina-I y -II (IGF-I y IGF-II), des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral) y factores osteoinductivos; (v) insulinas y proteínas relacionadas con la insulina, que incluyen, pero no se limitan a, insulina, cadena A de insulina, cadena B de insulina, proinsulina y proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; (vi) factores de crecimiento similar a la insulina, tales como, entre otros, factor VIII, factor tisular, factor de von Willebrand, proteína C, alfa-1-antitripsina, activadores del plasminógeno, tales como urocinasa y activador tisular del plasminógeno ("t-PA"), bombazina, trombina y trombopoyetina; (vii) factores estimulantes de colonias (CSF), que incluyen los siguientes, entre otros, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; (viii) otras proteínas de la sangre y séricas, que incluyen, pero no se limitan a, albúmina, IgE y antígeno de grupo sanguíneo; (ix) receptores y proteínas asociadas a receptores, que incluyen, por ejemplo, receptor de flk2/flt3, receptor de obesidad (OB), receptores de la hormona de crecimiento y receptores de linfocitos T; (x) factores neurotróficos, que incluyen, pero no se limitan a, factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF) y neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6); (xi) cadena A de relaxina, cadena B de relaxina y prorrelaxina; (xii) interferones, que incluyen, por ejemplo, interferón-alfa, -beta y -gamma; (xiii) interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; (xiv) antígenos víricos, que incluyen, pero no se limitan a, un antígeno vírico de la envoltura del sida; (xv) lipoproteínas, calcitonina, glucagón, factor natriurético auricular, tensioactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral-alfa y -beta, encefalinas, RANTES (regulada por activación normalmente expresada y secretada por linfocitos T), péptido asociado a la gonadotropina de ratón, Dnasa, inhibina y activina; (xvi) 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 recirculación, adresinas, proteínas reguladoras, inmunoadhesinas, proteínas de unión al antígeno; y (xvii) fragmentos biológicamente activos o variantes de cualquiera de los anteriores.

30 En cuanto a todo lo anterior, particularmente se prefieren los que son agentes terapéuticos eficaces, particularmente los que ejercen un efecto terapéutico uniéndose a diana, particularmente una diana entre las enumeradas anteriormente, que incluye dianas derivadas de los mismos, dianas relacionadas con los mismos, y modificaciones de los mismos.

35 Opcionalmente, la proteína de unión al antígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en: proteínas de unión al antígeno que se unen a cualquiera de: OPGL, miostatina, receptor de IL-4, IL1-R1, Ang2, NGF, CD22, receptor de IGF-1, B7RP-1, IFN gamma, TALL-1, factores de célula madre, Flt-3, IL-17 o receptor de IL-17.

40 Por ejemplo, un anticuerpo o pepticuerpo según la divulgación se puede caracterizar del siguiente modo: (i) anticuerpos y pepticuerpos específicos de OPGL (también denominados anticuerpos específicos de RANKL, pepticuerpos), que incluyen anticuerpos específicos de OPGL completamente humanizados y humanos, particularmente anticuerpos monoclonales completamente humanizados, que incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos descritos en la publicación internacional n.º WO 03/002713, que se incorpora en el presente documento en su totalidad en cuanto a anticuerpos específicos de OPGL, particularmente los que tienen las secuencias allí expuestas, particularmente, pero no se limitan a, los indicados allí: 9H7; 18B2; 2D8; 2E11; 16E1; y 22B3, incluyendo los anticuerpos específicos para OPGL que tienen la cadena ligera de SEQ ID NO: 2 como se expone allí en la Figura 2 y/o la cadena pesada de SEQ ID NO:4, como se expone allí en la Figura 4 del documento de patente WO 03/002713; (ii) agentes o pepticuerpos de unión a miostatina, que incluyen pepticuerpos específicos de miostatina, particularmente los descritos en la publicación de solicitud de EE. UU. n.º 2004/0181033, particularmente en partes relevantes para los pepticuerpos específicos de miostatina, que incluyen, pero no se limitan a, pepticuerpos de la familia mTN8-19, que incluyen TN8-19-1 a TN8-19-40, TN8-19 con1 y TN8-19 con2; pepticuerpos de la familia mL2; la familia mL15 de SEQ ID NO: 384-409; la familia mL17; la familia mL20; la familia mL21; la familia mL24; (iii) anticuerpos específicos de receptores de IL-4, particularmente los que inhiben actividades mediadas por la unión de IL-4 y/o IL-13 al receptor, que incluyen los descritos en la publicación internacional n.º WO 2005/047331 de la solicitud internacional n.º PCT/US2004/03742, particularmente en partes relevantes para los anticuerpos específicos de receptores de IL-4, particularmente dichos anticuerpos como se describen allí, particularmente, y sin limitación, los designados allí: L1H1; L1H2; L1H3; L1H4; L1H5; L1H6; L1H7; L1H8; L1H9; L1H10; L1H11; L2H1; L2H2; L2H3; L2H4; L2H5; L2H6; L2H7; L2H8; L2H9; L2H10; L2H11; L2H12; L2H13; L2H14; L3H1; L4H1; L5H1; L6H1; (iv) anticuerpos específicos del receptor 1 de interleucina 1 ("IL1-R1"), pepticuerpos, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la publicación de solicitud de EE. UU. n.º US2004/097712A1 en partes relevantes para las proteínas específicas de unión a IL1-R1, anticuerpos monoclonales, en particular, especialmente, sin limitación, los designados allí: 15CA, 26F5, 27F2, 24E12 y 10H7; (v) anticuerpos y pepticuerpos específicos de Ang2, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la publicación internacional n.º WO 03/057134 y la publicación de solicitud de EE. UU. n.º US2003/0229023, particularmente en partes relevantes para los anticuerpos y pepticuerpos específicos de Ang2, especialmente los de secuencias descritas allí y que incluyen, pero no se limitan a: L1(N); L1(N) WT; L1(N) 1K WT; 2xL1(N); 2xL1(N) WT; Con4 (N); Con4 (N) 1K WT, 2xCon4 (N) 1K; L1(C); L1(C) 1K; 2xL1 (C); Con4 (C); Con4 (C) 1K; 2xCon4 (C) 1K; Con4-L1 (N); Con4-L1 (C); TN-12-9 (N); C17 (N); TN8-8(N); TN8-14 (N); Con 1 (N), que también incluyen anticuerpos anti-Ang 2 y formulaciones tales como las descritas en la publicación internacional n.º WO 2003/030833, particularmente

Ab526; Ab528; Ab531; Ab533; Ab535; Ab536; Ab537; Ab540; Ab543; Ab544; Ab545; Ab546; A551; Ab553; Ab555; Ab558; Ab559; Ab565; AbF1AbFD; AbFE; AbFJ; AbFK; AbG1D4; AbGC1E8; AbH1C12; Ab1A1; Ab1F; Ab1KAb1P; y Ab1P, en sus diversas permutaciones como se describe allí; (vi) anticuerpos específicos de NGF, que incluyen, en particular, pero no se limitan a, los descritos en la publicación de solicitud de EE. UU. n.º US2005/0074821, que incluye en particular, pero no se limitan a, los anticuerpos específicos de NGF designados allí 4D4, 4G6, 6H9, 7H2, 14D10 y 14D11; (vii) anticuerpos específicos de CD22, tales como los descritos en la patente de EE. UU. 5.789.554, particularmente anticuerpos específicos de CD22 humana, tales como, pero no se limitan a, anticuerpos humanizados y completamente humanos, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales humanizados y completamente humanos, que incluyen particularmente, pero no se limitan a, anticuerpos IgG específicos de CD22 humana, tales como, por ejemplo, un dímero de un disulfuro de cadena gamma de hLL2 monoclonal de humano-ratón unido a una cadena kappa de hLL2 monoclonal de humano-ratón, que incluye, pero se limita a, por ejemplo, el anticuerpo completamente humanizado específico de CD22 humana en Epratuzumab, número de registro CAS 501423-23-0; (viii) anticuerpos específicos de receptor de IGF-1, tales como aquellos descritos en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2005/046493, que incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos específicos de IGF-1 designados allí L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51 y L52H52; (ix) anticuerpos específicos de proteína 1 relacionada con B-7 ("B7RP-1"), (B7RP-1 también se denomina en la bibliografía B7H2, ICOSL, B7h y CD275), particularmente anticuerpos IgG2 monoclonales completamente humanos específicos de B7RP, particularmente anticuerpo monoclonal IgG2 completamente humano que se une a un epítipo en el primer dominio de tipo inmunoglobulina de B7RP-1, especialmente los que inhiben la interacción de B7RP-1 con su receptor natural, ICOS, en linfocitos T activados, en particular, especialmente, en todos los aspectos anteriores, los desvelados en la solicitud provisional de EE. UU. n.º 60/700.265, presentada el 18 de julio de 2005, que incluye, pero no se limita a, anticuerpos designados allí como sigue: 16H; 5D; 2H; 43H; 41H; y 15H; (x) anticuerpos o pepticuerpos específicos de IL-15, tales como anticuerpos monoclonales humanizados, particularmente anticuerpos tales como los desvelados en las publicaciones de patente de EE. UU. n.º US2003/0138421; US2003/023586; US2004/0071702, que incluyen particularmente, por ejemplo, pero no se limitan a, anticuerpos HuMax IL-15, tales como, por ejemplo, 146B7; (xi) anticuerpos específicos de IFN gamma, especialmente anticuerpos específicos de IFN gamma humano, particularmente anticuerpos completamente humanos anti-IFN gamma, tales como, por ejemplo, los descritos en la publicación de patente de EE. UU. n.º US2005/0004353, particularmente, por ejemplo, los anticuerpos descritos allí 1118; 1118*; 1119; 1121; y 1121* (xii) anticuerpos específicos de TALL-1 y otras proteínas de unión específicas de TALL, tales como las descritas en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2003/0195156, particularmente las moléculas de las Tablas 4 y 5B; (xiii) anticuerpos específicos de CD20, tales como los descritos en las patentes de EE. UU. n.º 5.736.137 y 5.843.439, particularmente anticuerpos específicos de CD20 humana, tales como, pero no se limitan a, anticuerpos humanizados y completamente humanos, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales humanizados y completamente humanos, que incluyen particularmente, pero no se limitan a, anticuerpos IgG específicos de CD20 humana, que incluyen, pero se limitan a, por ejemplo, el anticuerpo quimérico de ratón/humano específico de CD20 rituximab, número de registro CAS 174722-31-7, y ofatumumab, número de registro CAS 679818-59-8; (xiv) anticuerpos específicos del péptido relacionado con el gen calcitonina (CGRP); (xv) anticuerpos específicos de plaquetas (por ejemplo, específicos de glucoproteína de plaquetas IIb/IIIa (PAC-1)); (xvi) anticuerpos específicos de esclerostina; y (xvii) anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, acopladores biespecíficos de linfocitos T (BiTEs), que incluyen anticuerpos biespecíficos que tienen afinidad por cualquiera de las dianas de proteína anteriores.

El anticuerpo o pepticuerpo se puede seleccionar del grupo que consiste en proteínas que se unen específicamente a uno o más de: CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34; HER2, HER3, HER4, el receptor de EGF; LFA-1, Mol, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina alfa v/beta 3; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); hormona de crecimiento, hormona estimulante tiroidea, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, factor liberador de hormona de crecimiento, hormona paratiroidea, hormona antidiurética, proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1-alfa), eritropoyetina (EPO), NGF-beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), aFGF, bFGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), TGF-alfa, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, IGF-I, IGF-II, des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), insulina, cadena A de insulina, cadena B de insulina, proinsulina, proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, tales como, entre otros, factor VIII, factor tisular, factor de von Willebrand, proteína C, alfa-1-antitripsina, activadores del plasminógeno, tales como urocinasa y activador tisular del plasminógeno (t-PA), bombazina, trombina y trombotopoyetina; M-CSF, GM-CSF, G-CSF, albúmina, IgE, receptor de flk2/flt3, receptor de obesidad (OB), factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), NT-3, NT-4, NT-5, NT-6); cadena A de relaxina, cadena B de relaxina, prorrelinaxina; interferón-alfa, -beta y -gamma; IL-1 a IL-10; antígeno vírico de la envoltura del sida; calcitonina, glucagón, factor natriurético auricular, tensioactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral-alfa y -beta, encefalinasa, RANTES, péptido asociado a la gonadotropina de ratón, Dnasa, inhibina y activina; proteína A o D, proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa y factor acelerador de la descomposición (DAF).

En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en: abciximab, adalimumab, alemtuzumab, basiliximab, belimumab, bevacizumab, brentuximab vedotin, canakinumab, cetuximab, certolizumab pegol, daclizumab, denosumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, golimumab, ibritumomab tiuxetan, infliximab, ipilimumab, muromonab-CD3, natalizumab, nivolumab, ofatumumab, omalizumab, palivizumab,

panitumumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, vedolizumab, y un medicamento biológico similar de cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno es rituximab (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 5.843.439). En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno comprende una región de proteína de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-8. Como se describe, pero no se reivindica en el presente documento, la proteína de unión al antígeno puede comprender una región variable de la cadena pesada que es al menos 90 %, por ejemplo, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o al menos 99 %, idéntica a SEQ ID NO: 1, y una región variable de la cadena ligera que es al menos 90 %, por ejemplo, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o al menos 99 %, idéntica a SEQ ID NO: 2; o comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las CDR de rituximab (SEQ ID NO: 3-8). En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno es infliximab (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 6.284.471); o como se describe, pero no se reivindica en el presente documento, la proteína de unión al antígeno puede comprender una región variable de la cadena pesada que es al menos 90 %, por ejemplo, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o al menos 99 %, idéntica a SEQ ID NO: 9, y una región variable de la cadena ligera que es al menos 90 %, por ejemplo, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o al menos 99 %, idéntica a SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno es ofatumumab (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 8.529.902); o como se describe, pero no se reivindica en el presente documento, la proteína de unión al antígeno puede comprender una región variable de la cadena pesada que es al menos 90 %, por ejemplo, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o al menos 99 %, idéntica a SEQ ID NO: 11, y una región variable de la cadena ligera que es al menos 90 %, por ejemplo, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o al menos 99 %, idéntica a SEQ ID NO: 12.

Ejemplos de proteínas de unión al antígeno según la presente divulgación engloban todas las anteriores y además incluyen variantes que retienen todas las CDR de cadena pesada de las mismas, y/o todas las CDR de cadena ligera de las mismas, y comprenden una región que es 70 % o más, especialmente 80 % o más, más especialmente 90 % o más, aún más especialmente 95 % o más, particularmente 97 % o más, más especialmente 98 % o más, aún más especialmente 99 % o más idéntica en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos de referencia de una proteína de unión al antígeno, como se ilustra anteriormente, particularmente una proteína farmacéutica de unión, tal como una secuencia de referencia de GenBank u otra secuencia de referencia de una proteína de referencia. La identidad a este respecto se puede determinar utilizando una diversidad de software de análisis de secuencias de aminoácidos bien conocidos y fácilmente disponibles. El software preferido incluye los que implementan los algoritmos de Smith-Waterman, considerados una solución satisfactoria al problema de búsqueda y alineación de secuencias. También se pueden emplear otros algoritmos, particularmente cuando la velocidad es una consideración importante. Programas comúnmente empleados para el alineamiento y la coincidencia de homología de ADNs, ARNs y polipéptidos que se pueden utilizar a este respecto incluyen FASTA, TFASTA, BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLASTN, PROSRCH, BLAZE y MPSRCH, siendo este último una implementación del algoritmo de Smith-Waterman para ejecución en procesadores masivamente paralelos fabricados por MasPar.

Variantes particularmente preferidas a este respecto tienen 50 % al 150 % de la actividad de la proteína de unión al antígeno de referencia mencionada anteriormente, particularmente realizaciones altamente preferidas a este respecto tienen 60 % al 125 % de la actividad de la proteína de unión al antígeno de referencia, realizaciones aún más altamente preferidas tienen 75 % al 110 % de la actividad de la proteína de unión al antígeno de referencia, realizaciones todavía más altamente preferidas tienen 85 % al 125 % la actividad de la referencia, realizaciones preferidas todavía más altamente tienen 90 % al 110 % de la actividad de la referencia.

Como se describe, pero no se reivindica en el presente documento, la divulgación proporciona formulaciones que comprenden una molécula de proteína de unión al antígeno reoxidada preparada usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Se pueden usar muchos reactivos y métodos convencionalmente empleados para la formulación de formulaciones farmacéuticas de proteína de unión al antígeno. De acuerdo con ellos, muchos métodos y componentes para formular y usar productos farmacéuticos que son bien conocidos y rutinarios en las ciencias pertinentes se pueden usar en el diseño, preparación y uso de formulaciones. Dichos métodos y componentes se describen en, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 21.^a ed.; Beringer et al. Editors, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. (2005); ANSEL'S PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 8.^a ed., Allen et al., Editors, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. (2005); y PHARMACEUTICAL FORMULATION OF PEPTIDES AND PROTEINS, Sven Frokjaer y Lars Hovgaard, editores, CRC Press, Boca Raton, Fla. (2000), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento en su totalidad, particularmente en partes relevantes para componentes y métodos convencionales que se pueden usar en una formulación que comprende una molécula de proteína de unión al antígeno reoxidada según diversos aspectos y realizaciones preferidas de la invención que se refieren a la misma.

Métodos y componentes adicionales que pueden ser útiles a este respecto se desvelan, entre otros, en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586; el documento de patente WO 2005/044854; la patente de EE. UU. n.º 6,288,030; patente de EE. UU. n.º 6.267.958; el documento de patente WO 2004/055164; la patente de EE. UU. n.º 4.597.966; US 2003/0138417; la patente de EE. UU. n.º 6,252,055; patente de EE. UU. n.º 5,608,038; patente de EE. UU. n.º 6.875.432; US 2004/0197324; el documento de patente WO 02/096457; la patente de EE. UU. n.º 5,945,098; patente de EE. UU. n.º 5,237,054; patente de EE. UU. n.º 6,485,932; patente de EE. UU. n.º 6,821,515; patente de EE. UU.

n.º 5,792,838; patente de EE. UU. n.º 5,654,403; patente de EE. UU. n.º 5,908,826; EP 0 804 163; y el documento de patente WO 2005/063291.

5 Diversos aspectos específicos de los componentes y tipos específicos de formulaciones se describen además a continuación, a modo de ilustración. Por lo tanto, la descripción proporcionada no es exhaustiva de los métodos y composiciones posibles para las formulaciones acuosas que comprenden una proteína de unión al antígeno reoxidada, ni de ningún modo es exclusiva.

10 Casi invariablemente, las formulaciones que comprenden una proteína de unión al antígeno reoxidada contendrán además componentes que incluyen, pero no se limitan de ningún modo a, excipientes y otros agentes farmacéuticos. Las formulaciones pueden contener, entre otros, excipientes, como se describen a continuación, que incluyen, pero no se limitan a, componentes para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, la osmolalidad, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la tonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la tasa de disolución o liberación, la adsorción o la penetración de formulaciones y/o proteína de unión al antígeno. Las formulaciones dependerán, por supuesto, de, por ejemplo, la proteína de unión al antígeno particular que se formula, los otros agentes activos, tales como otros productos farmacéuticos, que estarán comprendidos en la formulación, la vía de administración prevista, el método de administración a emplear, la dosis, la frecuencia de administración y el formato de administración, entre otros.

20 Como se describe, pero no se reivindica el presente documento, las formulaciones según la presente divulgación pueden proporcionar composiciones que comprenden una proteína de unión al antígeno reoxidada y un vehículo. La concentración de la proteína de unión al antígeno puede ser entre aproximadamente, en mg/ml: 10 y 400, o 10 y 300, o 10 y 250, o 10 y 200, o 10 y 150, o 10 y 100, o 10 y 70, o 10 y 50. Las formulaciones pueden proporcionar composiciones que comprenden una proteína de unión al antígeno reoxidada y un vehículo, y que comprenden además una o más sales farmacéuticamente aceptables; agentes de balance osmótico (agentes de tonicidad); antioxidantes; antibióticos; antimicóticos; agentes de carga; lioprotectores; antiespumantes; quelantes; conservantes; colorantes; analgésicos; o agentes farmacéuticos adicionales.

30 El vehículo puede ser un sólido, tal como un polvo en el que se puede dispersar una proteína. El vehículo puede ser un líquido, particularmente un líquido en el que la proteína autotamponante es altamente soluble, particularmente a concentraciones que proporcionan la capacidad de tampón deseada. Los vehículos líquidos pueden ser orgánicos o no orgánicos. Preferentemente son acuosos, lo más preferentemente comprenden en gran medida o completamente agua pura. En algunas realizaciones, el vehículo comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, acetato, succinato, citrato, histidina (imidazol), fosfato, Tris, o combinaciones de los mismos. El vehículo también puede comprender un tampón biológico que son tampones biológicos, tales como los descritos en, entre otros textos: TEITZ TEXTBOOK OF CLINICAL CHEMISTRY, 3.ª ed., Burtis y Ashwood, eds., W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pa. (1999), en particular en las Tablas 50-13 a 50-16; THE TOOLS OF BIOCHEMISTRY, Terrance G. Cooper, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1977), en particular Capítulo 1, páginas 1-35, lo más particularmente las Tablas 1-3, 1-4 y 1-5 y el texto referente a las mismas, y PROTEIN PURIFICATION PRINCIPLES AND PRACTICE, 3.ª ed., Robert K. Scopes, Springer-Verlag, New York, N.Y. (1994), en particular las páginas 160-164, especialmente en ellas las Tablas 6.4 y 6.5 y el texto referentes a las mismas, Capítulo 12, sección 3, páginas 324-333, especialmente en ellas las Tablas 12-4 y 12-5 y el texto referente a las mismas, y todo el Apéndice C: Buffers for Use in Protein Chemistry. En algunas realizaciones, la formulación es autotamponante, por ejemplo, como se describe en la publicación de patente de EE. UU. n.º 20080311078.

45 Como se describe, pero no se reivindica en el presente documento, las formulaciones según la presente divulgación pueden proporcionar composiciones que comprenden una proteína de unión al antígeno reoxidada y un vehículo, en una disolución que es hipotónica, isotónica o hipertónica, preferentemente aproximadamente isotónica, y puede comprender uno o más polioles que incluyen azúcares, especialmente preferentemente uno cualquiera o más de sorbitol, manitol, sacarosa, glucosa, lactosa, trehalosa, propilenglicol o glicerol. Las formulaciones pueden comprender además uno o más tensioactivos farmacéuticamente aceptables, preferentemente uno o más de polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácidos grasos de sorbitano, polietoxilatos o poloxámero 188. Se pueden usar excipientes adicionales en la formulaciones según la divulgación para una amplia variedad de fines, tales como el ajuste de propiedades físicas, químicas o biológicas de formulaciones, tales como el ajuste de la viscosidad, y o procesos de la invención para mejorar la eficacia y o para estabilizar dichas formulaciones y procesos contra la degradación y el deterioro debido a, por ejemplo, tensiones que ocurren durante la fabricación, el envío, el almacenamiento, la preparación previa al uso, la administración y después.

60 Como se describe, pero no se reivindica en el presente documento, las formulaciones según la presente divulgación pueden comprender una o más sales, por ejemplo, para ajustar la fuerza iónica y/o la isotonicidad y/o la viscosidad de la formulación y/o para mejorar la solubilidad y/o estabilidad física de la proteína de unión al antígeno reoxidada. Opcionalmente, la concentración de sales es inferior a 150 mM, por ejemplo, inferior a 125 mM, inferior a 100 mM, inferior a 75 mM, inferior a 50 mM, o inferior a 25 mM. En algunas realizaciones, una formulación según la divulgación comprende uno o más aminoácidos, por ejemplo, lisina, prolina, serina, alanina, glicina, arginina, metionina o combinaciones de las mismas como, por ejemplo, un agente de carga, estabilizador y/o antioxidante.

65

Como se describe, pero no se reivindica en el presente documento, las formulaciones según la presente divulgación pueden comprender uno o más antioxidantes, por ejemplo, uno o más de un agente reductor, un secuestrante de oxígeno/radicales libres, o agente quelante, que incluye, pero no se limita a, EDTA y glutatión. Por ejemplo, la cantidad de EDTA puede estar entre 0,5 y 15 mM, tal como 1 y 10 mM, 2 y 8 mM, 3 y 7, mM, 3 y 4 mM, 4 y 5 mM, o 5 y 6 mM. Por ejemplo, la concentración de EDTA es 5 mM. El EDTA pueden inhibir la tiorredoxina o proteína similar a la tiorredoxina. Una formulación puede comprender uno o iones metálicos, que incluyen, pero no se limitan a, metales con un estado de oxidación 2⁺ o superior (tal como 3⁺ o 4⁺), tal como Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Sr²⁺ o Al³⁺. La concentración de metal puede estar entre 1 y 900 ppm, tal como 10 y 800 ppm, 100 y 700 ppm, 10 y 100 ppm, 100 y 200 ppm, 200 y 300 ppm, 300 y 400 ppm, 400 y 500 ppm, 500 y 600 ppm, o 600 y 700 ppm.

Opcionalmente, una formulación puede comprender un conservante, para inhibir el crecimiento microbiano y mantener la esterilidad. Los ejemplos de conservantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, alcohol bencílico, fenol, m-cresol, alcohol butílico, parabenos, resorcinol, catecol, ciclohexanol, 3-pentanol, sales de amonio cuaternario y combinaciones de los mismos.

Hay disponible una diversidad de exposiciones sobre materiales y métodos de formulación y estabilización de proteínas útiles a este respecto, tales como Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution", en: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter y Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), y Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002).

Las formulaciones se pueden administrar mediante una variedad de vías adecuadas, bien conocidas por los expertos en la técnica de administración de terapéuticos a un sujeto. Dichas vías en una variedad de realizaciones incluyen, pero no se limitan a, administración de las composiciones por vía oral, por vía ocular, por vía mucosa, por vía tópica, por vía rectal, por vía pulmonar, tal como por espray para inhalación, y por vía epicutánea. Las siguientes vías de administración parenteral también son útiles en diversas realizaciones de la invención: administración por inyección intravenosa, intrarterial, intracardiaca, intraespinal, intratecal, intraósea, intrarticular, intrasinoval, intracutánea, intradérmica, subcutánea, peritoneal y/o intramuscular. En algunas realizaciones se usan inyección intravenosa, intrarterial, intracutánea, intradérmica, subcutánea y/o intramuscular. En algunas realizaciones, se usan inyección subcutánea y/o intramuscular.

La presente divulgación se entenderá más fácilmente como referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes.

Ejemplos

La presente invención se describe adicionalmente a modo de los siguientes ejemplos ilustrativos, no limitantes.

Ejemplo 1

Reducción de moléculas de anticuerpo durante la producción de anticuerpos

Las producción y purificación de moléculas de anticuerpo recombinante de células hospedadoras cultivadas en un biorreactor puede dar como resultado la reducción parcial de algunas de las moléculas de anticuerpo, reduciéndose así la eficacia terapéutica de las moléculas. La reducción parcial de las moléculas de anticuerpo puede empezar en el biorreactor y continuar durante el proceso de producción y purificación, aunque se añaden etapas de aireación en un intento por reoxidar las moléculas de anticuerpo reducidas. Los siguientes ejemplos investigan la reducción de moléculas de anticuerpo durante el transcurso del proceso de producción y purificación y los efectos de una o más etapas de filtración en profundidad sobre el potenciamiento de la reoxidación de las moléculas de anticuerpo y la reducción del porcentaje de moléculas de anticuerpo reducidas en una disolución acuosa.

Se recogió líquido de cultivo celular que comprendía moléculas de anticuerpo recombinante y se clarificó usando microfiltración por flujo cruzado. El líquido de cultivo celular (HCCF) recogido se burbujeó con aire y/o se enfrió y opcionalmente se sometió a uno o más ciclos de congelación/descongelación. Se llevó a cabo cromatografía en proteína A según las instrucciones del fabricante de la resina para formar una mezcla de proteína A. Se analizaron la cantidad de moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas en HCCF y la mezcla de proteína A usando ECnr-SDS para determinar el porcentaje de especies pre-pico correspondientes a moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas. Los anticuerpos parcialmente reducidos estuvieron presentes en el HCCF, pero el porcentaje de anticuerpos reducidos fue significativamente mayor en la mezcla de proteína A en comparación con el HCCF.

En un ejemplo particular, se cultivaron células hospedadoras que producen un anticuerpo IgG1 anti-CD20 con una cadena ligera kappa que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1, y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 2 (anticuerpo A) en un biorreactor durante hasta 15 días. Se recogió el líquido de cultivo celular que comprendía el anticuerpo y se clarificó usando microfiltración por flujo cruzado. El líquido de cultivo celular (HCCF) recogido se burbujeó entonces con aire y/o se enfrió para mantener 80 ± 15 % de oxígeno disuelto y/o una

temperatura de 2 °C a 8 °C. El HCCF burbujeado/enfriado se llevó a temperatura ambiente antes de ser sometido a una cromatografía en proteína A usando una resina AKTA Explorer y MabSelect SuRE (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) según las instrucciones del fabricante para formar una mezcla de proteína A. Se analizaron la cantidad de moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas en el HCCF y la mezcla de proteína A usando ECnr-SDS para determinar el porcentaje de especies pre-pico correspondientes a moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas (Figura 1). La reducción de moléculas de anticuerpo empezó en el biorreactor. A pesar de una disminución en el porcentaje de anticuerpos parcialmente reducidos después del burbujeo de aire y el enfriamiento del líquido de cultivo celular, la reducción de los enlaces disulfuro continuó después de la recogida, y el porcentaje de especies pre-pico fue significativamente mayor en la mezcla de proteína A en comparación con el líquido de cultivo celular recogido. Por lo tanto, las condiciones controladas de oxígeno y temperatura, es decir, burbujeo de aire y enfriamiento del líquido de cultivo celular recogido, no fueron suficientes para prevenir la reducción parcial de las moléculas de anticuerpo y no potenció suficientemente la reoxidación.

Ejemplo 2

Reoxidación potenciada de moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas después de la filtración en profundidad cargada

Se sometió a cromatografía en proteína A una disolución acuosa de anticuerpo que comprendía el anticuerpo A como se ha descrito anteriormente y entonces se realizó una etapa de inactivación vírica que comprendía reducir el pH de la mezcla de proteína A a aproximadamente pH 3,6 durante 1 hora y luego ajustar a pH 5 para formar una mezcla de inactivación vírica neutralizada (MIVn). La MIVn se sometió a filtración en profundidad cargada usando un sistema de filtro en profundidad cargado MILLISTAK+ A1HC (EMD Millipore), seguida por filtración estéril usando un filtro estéril Millipore EXPRESS SHC según las instrucciones del fabricante para formar una mezcla de inactivación vírica filtrada (MIVf). La filtración se realizó usando un sistema de filtración de flujo normal (PendoTECH, Princeton, NJ) con el filtro conectado a un sensor de presión para monitorizar y controlar el límite de presión. El caudal y la presión se mantuvieron a \leq aproximadamente 200 LMH y \leq aproximadamente 345 kPa (50 psi), respectivamente. El filtro se lavó primero con agua desionizada para aproximadamente 100 l/m², seguido por una fase de equilibrado con tampón acetato 30 mM, pH 5,0, para \geq aproximadamente 50 l/m² antes de cargar la disolución a filtrar en el intervalo de aproximadamente 50 l/m² a aproximadamente 800 l/m². Al final, el filtro se lavó con aproximadamente 20 l/m² de tampón de equilibrio. Se determinó el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico medido por ECnr-SDS en la mezcla de proteína A y la MIVf (Figura 2). Después del contacto con el filtro en profundidad cargado, la cantidad de anticuerpo parcialmente reducido en la mezcla de proteína A se redujo significativamente, con una disminución superior a 3 veces en el % de pre-picos observado. Toda la masa de producto de mezcla de proteína A se recuperó después de la filtración usando el filtro en profundidad cargado, lo que demuestra que la disminución en el % de especies pre-pico fue debida a la reoxidación del anticuerpo parcialmente reducido después del contacto con el filtro en profundidad cargado según la divulgación y no a la pérdida de moléculas de anticuerpo. La presencia de tiorredoxina y tiorredoxina reductasa se determinó usando espectrofotometría de masas. Las proteínas de tipo tiorredoxina estuvieron presentes en la mezcla de proteína A, pero el filtrado en profundidad cargado estuvo libre tanto de tiorredoxina como de tiorredoxina reductasa.

Para evaluar adicionalmente la reoxidación potenciada de moléculas de anticuerpo, se preparó una mezcla de proteína A y se puso en contacto con un filtro en profundidad cargado para formar una MIVf como se ha descrito anteriormente o no se filtró más y entonces se mantuvo a temperatura ambiente o a temperatura entre 2 °C y 8 °C, durante hasta 8 días. Se determinó el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico medido por ECnr-SDS en la MIVf (Figura 3A) o mezcla de proteína A no filtrada en profundidad cargada (Figura 3B). El porcentaje de especies pre-pico en la MIVf continuó reduciéndose después del contacto con el filtro en profundidad cargado, y la reoxidación se potenció tanto a temperatura ambiente como a entre 2 °C y 8 °C. La cantidad de moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas en la MIVf disminuyó casi tres veces y alcanzó un nivel de estado estacionario en tres días o menos. A diferencia, el porcentaje de especies pre-pico en la mezcla de proteína A no filtrada continuó aumentando con el tiempo a ambas temperaturas, que indica reducción adicional de las moléculas de anticuerpo, con reducción cinética más rápida a temperatura ambiente en comparación con cuando se enfría.

La filtración en profundidad cargada también fue eficaz en potenciar la reoxidación de moléculas de anticuerpo cuando se realizó antes de la cromatografía en proteína A. El HCCF se sometió a filtración en profundidad cargada usando un sistema de filtro en profundidad cargado MILLISTAK+ X0HC (EMD Millipore) según las instrucciones del fabricante y a un caudal 350 l/m² o no se filtró y entonces se sometió a cromatografía en proteína A para formar una mezcla de proteína A. Se determinó el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico medido por ECnr-SDS en la mezcla de proteína A filtrada en profundidad cargada o la mezcla de proteína A no filtrada en profundidad cargada (Figura 4A y Figura 4B). Hubo una reducción de aproximadamente 2 veces (50 %) en el porcentaje de especies pre-pico observadas en la mezcla de proteína A usando el filtrado en profundidad cargado como material de carga, en comparación con el control no filtrado (Figura 4A). Además, la mezcla de proteína A del filtrado en profundidad cargado fue más estable, siguiendo el porcentaje de especies pre-pico relativamente constante, en comparación con el control no filtrado, cuyos niveles de moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas continuaron aumentando después de la cromatografía en proteína A (Figura 4B).

Los resultados demostraron que poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de anticuerpo con un filtro en profundidad cargado según la divulgación potenció eficazmente la reoxidación de las moléculas de anticuerpo, dando como resultado una cantidad reducida de moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas.

5 Ejemplo 3

Comparación de métodos de filtración en la reoxidación de moléculas de anticuerpo

Se produjo una MIVn como se describe en el Ejemplo 2 y se sometió a filtración en profundidad cargada usando un sistema de filtración en profundidad MILLISTAK+ A1HC o a filtración en membrana estéril usando un filtro hidrófilo Millipore EXPRESS SHC a un caudal 350 l/m². Se determinó el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico medido por ECnr-SDS en la MIVn cargada en el sistema de filtro y después de la filtración (Figura 5A y Figura 5B). Se mostró que la filtración en profundidad cargada facilitaba la reoxidación de material incluso altamente reducido, logrando una disminución en el porcentaje de especies pre-pico del 45 % en la carga a menos del 10 % en el filtrado del filtro en profundidad (Figura 5A). El porcentaje de especies pre-pico en la MIVn y el filtrado del filtro estéril fue comparable, que indica que la aireación debida a la filtración únicamente no facilitó la reoxidación de las moléculas de anticuerpo. Sin embargo, hubo una disminución superior a dos veces en el % de pre-picos observado en el filtrado del filtro en profundidad cargado, en comparación con el filtrado del filtro estéril inmediatamente después de la filtración (t=0). Además, el porcentaje de especies pre-pico en el filtrado del filtro en profundidad cargado continuó reduciéndose durante las primeras cuatro horas después del mantenimiento de la filtración y se logró el nivel de estado estacionario a las 4 horas, que era más de tres veces inferior al porcentaje de especies pre-pico en la MIVn o filtrado de filtro estéril. El uso de un filtro en profundidad cargado específicamente, y no el acto del filtrado, facilitaron así la reoxidación de anticuerpos parcialmente reducidos.

25 Ejemplo 4

Efecto de la filtración en profundidad cargada y oxigenación sobre la reoxidación de moléculas de anticuerpo

Se sometió una disolución acuosa que comprendía anticuerpo A a cromatografía en proteína A seguida por (a) una etapa de inactivación vírica y luego filtración en profundidad cargada usando un sistema de filtro en profundidad cargado MILLISTAK+ A1HC para formar una MIVf; (b) una etapa de inactivación vírica para formar una MIVn seguida por burbujeo de aire hasta el 100 % de oxígeno disuelto; o (c) inactivación vírica solo para formar una MIVn seguida por una etapa de mantenimiento durante hasta 50 horas, o (d) la etapa de mantenimiento solo como control. Se comparó el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico medido por ECnr-SDS en la mezcla de proteína A, MIVf, MIVn oxigenada con aire y MIVn sin aire (Figura 6). El porcentaje inicial de especies pre-pico fue comparable entre la mezcla de proteína A y las MIVn, independientemente de si la MIVn se oxigenó con aire. A diferencia, la cantidad de moléculas de anticuerpo reducidas tras la filtración en profundidad cargada en la MIVf fue aproximadamente dos veces menor. El porcentaje de especies pre-pico en la MIVf continuó reduciéndose durante el mantenimiento, alcanzando un nivel de estado estacionario más de tres veces inferior a la mezcla de proteína A o MIVn no oxigenada y más de dos veces inferior a la MIVn oxigenada. Por lo tanto, la presencia de 100 % de oxígeno saturado tuvo un impacto mínimo sobre la reoxidación de las moléculas de anticuerpo y fue mucho menos eficaz que la filtración en profundidad cargada en disminuir la cantidad de moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas.

45 Ejemplo 5

Efecto del caudal del filtro en profundidad cargado sobre la reoxidación de moléculas de anticuerpo

Se evaluó el efecto del caudal, es decir, la cantidad total de disolución acuosa en contacto con un filtro en profundidad cargado por metro cuadrado de filtro, sobre la reoxidación de anticuerpos parcialmente reducidos. Disoluciones acuosas que comprendían el anticuerpo A se sometieron a filtración en profundidad cargada usando un filtro MILLISTAK+ A1HC como se ha descrito anteriormente a un caudal de 350 l/m² a 850 l/m², y se midió el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico por ECnr-SDS hasta 24 horas después de la filtración (Figura 7A). A medida que aumentó el caudal, se ralentizó la cinética de reoxidación de las moléculas de anticuerpo durante las primeras horas tras la filtración; sin embargo, 24 horas después de la filtración, todo el caudal probado logró el mismo porcentaje en estado estacionario de especies pre-pico, lo que demuestra la amplia aplicabilidad de los métodos de la divulgación para fines industriales. Un experimento similar realizado usando un filtro en profundidad cargado Cuno Zeta+ SP90 a un caudal 150 l/m² a 450 l/m² también logró reoxidación potenciada y una disminución en el nivel de reducción de anticuerpo parcial a todos los caudales probados (Figura 7B).

60 Ejemplo 6

Efecto de la cromatografía CEX sobre la reoxidación de moléculas de anticuerpo

Se sometió una disolución acuosa que comprendía anticuerpo A a cromatografía en proteína A y luego a una etapa de inactivación vírica para formar una MIVn. La MIVn se sometió a (a) cromatografía CEX solo a 50 g/l usando una resina FRACTOGEL SO3 (EMD Millipore) para formar una mezcla de CEX; (b) filtración en profundidad cargada solo

usando un sistema de filtro en profundidad MILLISTAK+ A1HC para formar una MIVf, o (c) filtración en profundidad cargada para formar una MIVf, seguida por cromatografía CEX, como se describe en (a) y (b), para formar una mezcla de CEX. La etapa de CEX se diseñó para resolver las especies de alto peso molecular (HMW) en un modo de unir y eluir. Las moléculas de anticuerpo parcial pueden dimerizar en la resina por el tiol libre y eluir como especies HMW. El nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico se midió por ECnr-SDS antes y después de la cromatografía CEX de la MIVn (Figura 8A) e inmediatamente después de la cromatografía CEX de MIVf de filtro en profundidad cargado (Figura 8B), así como 4 horas después de la cromatografía CEX de MIVf de filtro en profundidad cargado (Figura 8C). El porcentaje de especies de HMW también se determinó como una medida de moléculas de anticuerpo parcial. El porcentaje de especies reducidas pre-pico en la MIVn no filtrada en filtro en profundidad cargado antes y después de la cromatografía CEX fue comparable (Figura 8A). El nivel de anticuerpo reducido en la MIVf fue más de tres veces inferior que en la MIVn después de la filtración en profundidad cargada. El porcentaje de especies pre-pico en la MIVf de filtro en profundidad cargado disminuyó adicionalmente en más de 1,5 veces inmediatamente después de la cromatografía CEX (Figura 8B) y fue comparable 0 y 4 horas después de la cromatografía CEX (Figuras 8B y 8C). Además, el porcentaje de especies de HMW en la MIVf de filtro en profundidad cargado disminuyó después de la cromatografía CEX, lo que confirma una disminución en las moléculas de anticuerpo parcial. Los resultados indicaron que la reoxidación de las especies de anticuerpo después de la filtración en profundidad cargada continuó en la columna CEX y alcanzó el estado estacionario.

Ejemplo 7

Efecto de los componentes del filtro en profundidad cargado sobre la reoxidación de moléculas de anticuerpo

Se lavó un filtro en profundidad cargado con agua desionizada para 100 l/m², seguido por una fase de recirculación de 2 horas con una disolución 0,1 M de H₂SO₄ para arrastrar el filtro y retirar los metales unidos, o con una disolución 100 mM de acetato, pH 5,0, como control. Una disolución acuosa que comprendía anticuerpo A se sometió a cromatografía en proteína A y luego una etapa de inactivación vírica seguida por una etapa de neutralización para formar una MIVn. Después de la recirculación de 2 horas, se añadieron disoluciones de acetato y sulfúrico a muestras de MIVn en diferentes relaciones de volumen de 0,5, 1, 2 y 4 partes de tampón a 1 parte de MIVn. La disolución de sulfúrico contuvo metales unidos y otro material arrastrado del filtro en profundidad cargado. Por ejemplo, la disolución de sulfúrico contuvo aproximadamente 1500 partes por billón (ppb) de Cu²⁺, mientras que la disolución de acetato comparada menos de 5 ppb de Cu²⁺. El nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en las muestras con adición se midió por ECnr-SDS 0, 2, 4 y 24 horas después de la adición. Como era de esperar, MIVn sin adición no presentó reoxidación de las moléculas de anticuerpo. A diferencia, el porcentaje de especies pre-pico en la MIVn añadida con la disolución de sulfúrico fue significativamente menor (Figura 9A). El porcentaje de especies pre-pico en la MIVn añadida con la disolución de ácido sulfúrico a una concentración de 1x o superior alcanzó el estado estacionario a t=0, que indicó que el contacto de la MIVn con los componentes arrastrados del filtro en profundidad cargado potenció eficientemente la reoxidación. La adición a MIVn de la disolución de acetato no fue tan eficiente en facilitar la reoxidación de las moléculas de anticuerpo como la disolución de sulfúrico o el contacto directo de anticuerpo con el filtro en profundidad (Figura 9B). El porcentaje de especies pre-pico en la MIVn añadida con la disolución de acetato fue mayor a t=0 en comparación con la MIVn con adición de disolución de sulfúrico, y el estado estacionario no se alcanzó todavía después de un mantenimiento de 24 horas. Los resultados demostraron que los componentes obtenidos del filtro en profundidad cargado fueron capaces de potenciar eficientemente la reoxidación de moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas.

Ejemplo 8

Procesos de reoxidación de moléculas de anticuerpo reducidas

La Tabla 1 describe los procesos A a N para preparar disoluciones acuosas que comprenden moléculas de anticuerpo reoxidadas.

TABLA 1

Etapas de proceso	Proceso													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Filtración en profundidad	X		X	X	X	X								X
Cromatografía en proteína A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Filtración en profundidad	X	X		X	X	X			X		X			
Inactivación vírica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Filtración en profundidad	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X		X
Cromatografía de intercambio catiónico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Etapas de proceso	Proceso													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Filtración en profundidad	X	X	X	X		X		X		X	X		X	X
Cromatografía adicional (por ejemplo, STIC PA, HIC, MMC)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Filtración en profundidad	X	X	X	X	X					X		X	X	

- 5 Primero, se obtienen disoluciones acuosas que comprendían moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, por ejemplo, HCCF, sin burbujear el cultivo celular fluido con aire. En el proceso A, por ejemplo, la disolución acuosa se somete a una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un primer filtrado, y el primer filtrado se somete a una etapa de cromatografía en proteína A para formar un primer eluido. El primer eluido se somete a una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un segundo filtrado, y el segundo filtrado se somete a una etapa de inactivación vírica a pH bajo para formar un segundo filtrado inactivado víricamente. El segundo filtrado inactivado víricamente se somete a una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un tercer filtrado.
- 10 El tercer filtrado se somete a una etapa de cromatografía de intercambio catiónico para formar un segundo eluido, seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un cuarto filtrado. El cuarto filtrado se somete a una o más etapas de cromatografía adicional, por ejemplo, STIC PA, HIC y/o MMC, para formar un tercer (o cuarto o quinto) eluido, seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un quinto filtrado.
- 15 En otro ejemplo, para el proceso B, la disolución acuosa se somete a una etapa de cromatografía en proteína A para formar un primer eluido. El primer eluido se somete a una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un primer filtrado, y el primer filtrado se somete a una etapa de inactivación vírica a pH bajo para formar un primer filtrado inactivado víricamente. El primer filtrado inactivado víricamente se somete a una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un segundo filtrado. El segundo filtrado se somete a una etapa de cromatografía de intercambio
- 20 catiónico para formar un segundo eluido, seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un tercer filtrado. El tercer filtrado se somete a una o más etapas de cromatografía adicional, por ejemplo, STIC PA, HIC y/o MMC, para formar un tercer (o cuarto o quinto) eluido, seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un cuarto filtrado.
- 25 En cualquiera de los procesos A a N, el proceso opcionalmente adicional incluye etapas de purificación posteriores adicionales, por ejemplo, una o más etapas de ultrafiltración, diafiltración y filtración vírica, para lograr una disolución acuosa que comprende moléculas de anticuerpo reoxidadas. En cualquiera de los procesos A a N, la disolución acuosa que comprende moléculas de anticuerpo reoxidadas lograda usando el proceso tiene un porcentaje reducido de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, en comparación con el porcentaje de moléculas de proteína de
- 30 unión al antígeno reducidas observado antes del inicio del proceso.
- Los Ejemplos anteriores demuestran que poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro en profundidad cargado según la divulgación potencia eficazmente la reoxidación de moléculas de proteína de unión al antígeno parcialmente reducidas, restaurando así la integridad
- 35 estructural y la función biológica y terapéutica relacionada de los anticuerpos.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de una formulación acuosa de una proteína de unión al antígeno que comprende
 5 (a) poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro en profundidad cargado, en donde el filtro en profundidad cargado comprende un ion metálico seleccionado del grupo que consiste en un ion sodio, ion calcio, ion magnesio, ion mercurio, ion cromo, ion cadmio, ion aluminio, ion potasio, ion plomo, ion arsénico, ion cobalto, ion hierro, ion manganeso, ion titanio, ion cinc, ion níquel, ion cobre y combinaciones de los mismos; y
 10 (b) medir una cantidad o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas en la disolución después de poner en contacto la disolución acuosa con el filtro en profundidad cargado, en donde el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas disminuye en al menos 20 % en comparación con el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas observado antes de la etapa de poner en contacto.
2. Un método de potenciamiento de la reoxidación de una proteína de unión al antígeno que comprende
 15 (a) poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro en profundidad cargado, en donde el filtro en profundidad cargado comprende un ion metálico seleccionado del grupo que consiste en un ion sodio, ion calcio, ion magnesio, ion mercurio, ion cromo, ion cadmio, ion aluminio, ion potasio, ion plomo, ion arsénico, ion cobalto, ion hierro, ion manganeso, ion titanio, ion cinc, ion níquel, ion cobre y combinaciones de los mismos; y
 20 (b) medir una cantidad o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, en donde la reoxidación de las moléculas de proteína de unión al antígeno aumenta al menos dos veces después de la etapa de poner en contacto.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la etapa (a) va precedida de someter la disolución
 25 de moléculas de proteína de unión al antígeno a cromatografía en proteína A.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además una etapa de inactivar uno o más virus en dicha disolución de moléculas de proteína de unión al antígeno.
- 30 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la puesta en contacto ocurre
 (a) a temperatura ambiente; o
 (b) a una temperatura de 2 grados a 8 grados Celsius.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además
 35 (a) una etapa de burbujear aire u oxígeno a través de la disolución de moléculas de proteína de unión al antígeno; y/o
 (b) poner en contacto la disolución de moléculas de proteína de unión al antígeno con un ion positivo seleccionado del grupo que consiste en sodio, calcio, magnesio, mercurio, molibdeno, cromo, cadmio, aluminio, potasio, cobalto, hierro, manganeso, titanio, cinc, níquel, cobre y combinaciones de los mismos.
- 40 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la disolución de moléculas de proteína de unión al antígeno se pone en contacto con más de un filtro en profundidad cargado.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el filtro en profundidad cargado comprende una
 45 capa de tierra de diatomeas, opcionalmente que comprende además una capa de celulosa y una fase inorgánica, en donde la fase inorgánica comprende una resina de poliamina.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el filtro en profundidad cargado comprende un ion cobre.
- 50 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la puesta en contacto ocurre a un caudal entre 250 l/m² y 850 l/m².
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la proteína de unión al antígeno es un anticuerpo IgG, en donde el anticuerpo IgG es opcionalmente un anticuerpo IgG1 (opcionalmente un anticuerpo IgG1 con una cadena ligera kappa o un anticuerpo IgG1 con una cadena ligera lambda) o anticuerpo IgG2.
- 55 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la proteína de unión al antígeno
 (a) une un antígeno seleccionado del grupo que consiste en RANKL, factor de necrosis tumoral alfa, receptor del factor de crecimiento epidérmico, CD20, péptido relacionado con el gen calcitonina, esclerostina y glucoproteína de plaquetas IIb/IIIa;
 60 (b) se selecciona del grupo que consiste en abciximab, adalimumab, alemtuzumab, basiliximab, belimumab, bevacizumab, brentuximab vedotin, canakinumab, cetuximab, certolizumab pegol, daclizumab, denosumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, golimumab, ibritumomab tiuxetan, infliximab, ipilimumab, muromonab-CD3, natalizumab, nivolumab, ofatumumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, vedolizumab y un medicamento biológico similar de cualquiera de los anteriores; o
 65

(c) comprende una región de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-8.

5 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la cantidad de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas se mide usando electroforesis capilar no reducida con dodecilsulfato de sodio.

14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende además una etapa de cromatografía de intercambio catiónico.

10 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que comprende (1) una etapa de cromatografía en proteína A, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; (2) una etapa de inactivación vírica, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; y (3) una etapa de cromatografía de intercambio catiónico, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; comprendiendo opcionalmente además una o más de
15 (4) una etapa de cromatografía de interacción intolerante a la sal, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; (5) una etapa de filtración de virus, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; y (5) ultrafiltración y/o diafiltración, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada.

20 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde después del contacto con un filtro en profundidad cargado, el filtrado se incuba durante al menos aproximadamente 4 horas antes de someterse a una cromatografía en proteína A.

25 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde la cantidad o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas se determina usando electroforesis capilar no reducida con dodecilsulfato de sodio (ECnr-SDS).

18. El método de la reivindicación 1, que comprende (1) una etapa de cromatografía en proteína A, (2) una etapa de inactivación vírica; (3) una etapa de filtración en profundidad; y (4) una etapa de incubación durante al menos cuatro horas.

30 19. El método de la reivindicación 18, que comprende además (5) una etapa de cromatografía de intercambio catiónico; y una o más de (6) una etapa de cromatografía de interacción intolerante a la sal; (7) una etapa de filtración de virus; y (8) ultrafiltración y/o diafiltración.

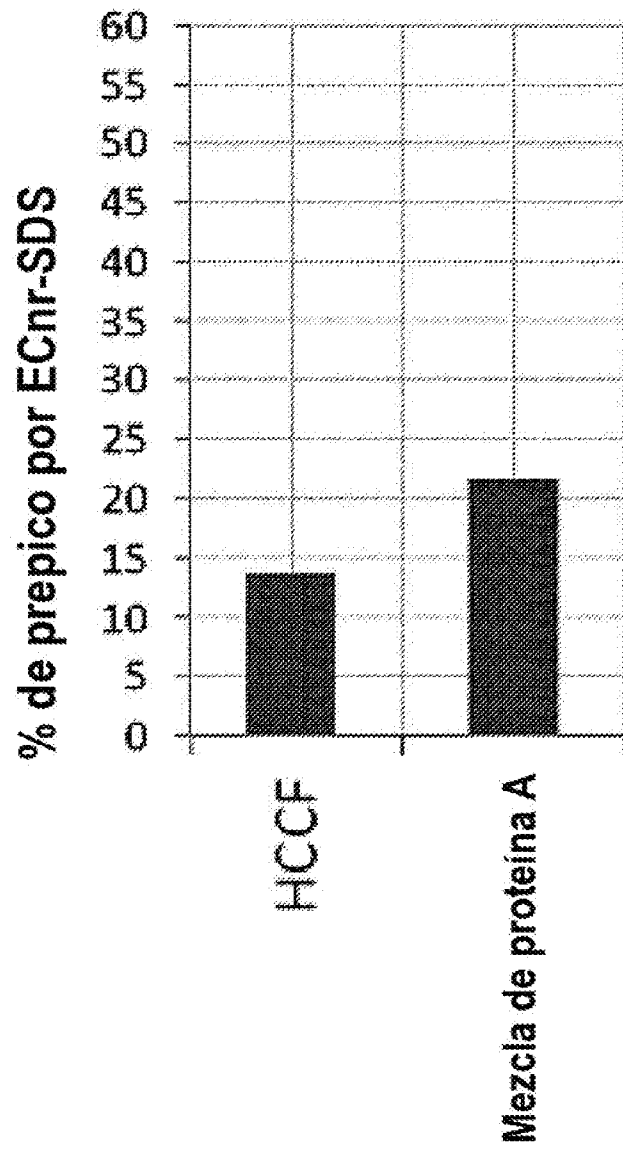


Figura 1

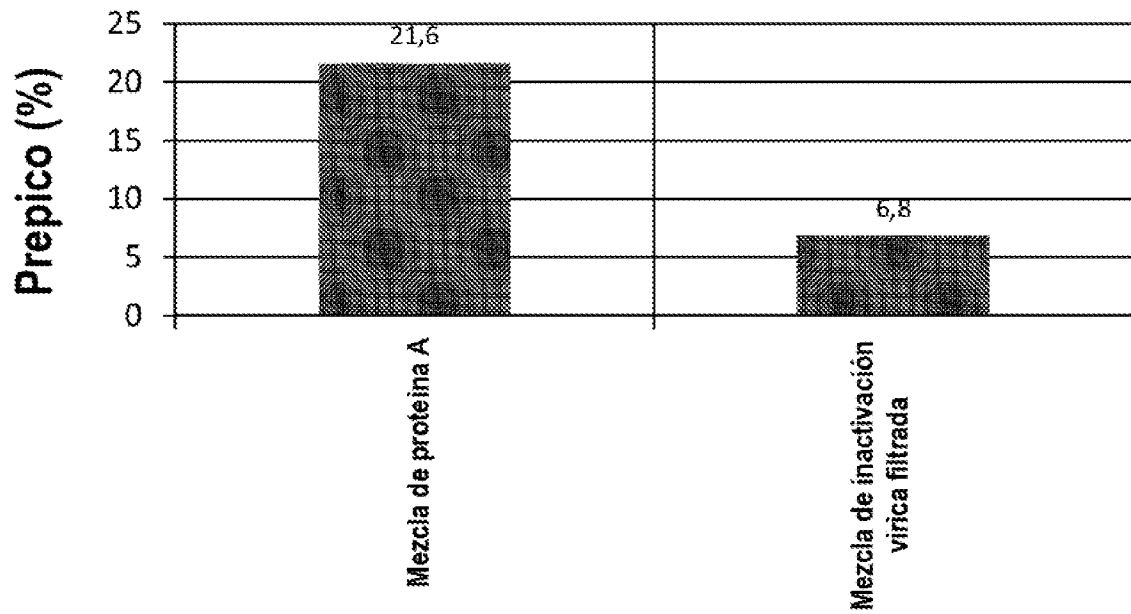


Figura 2

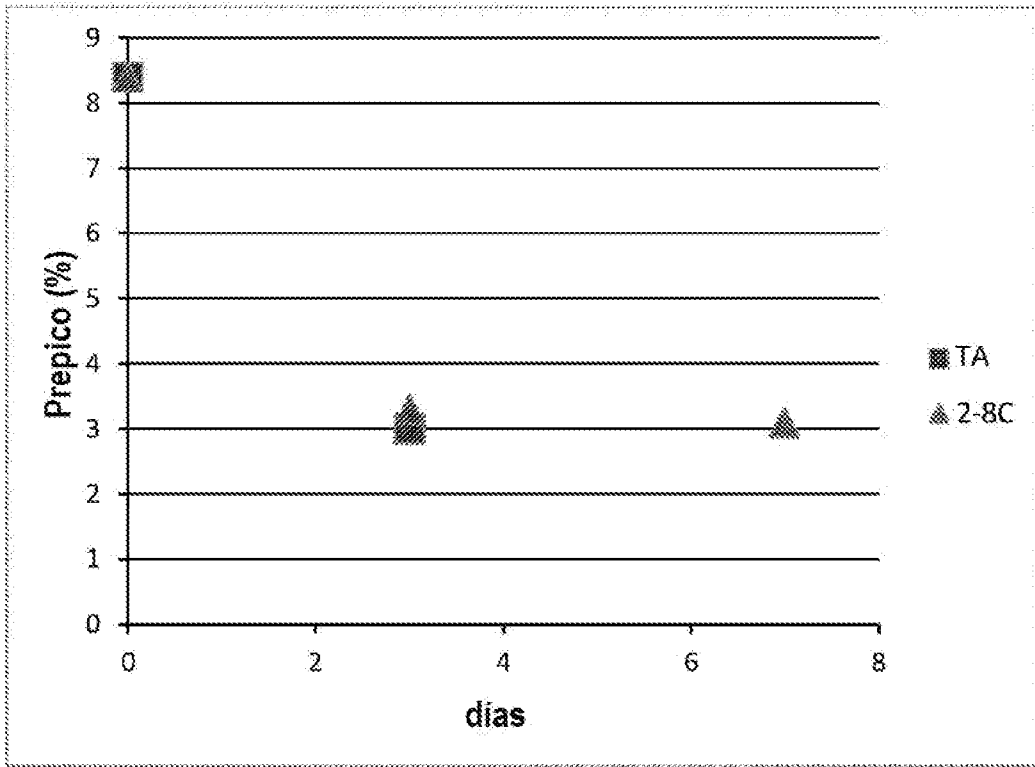


Figura 3A

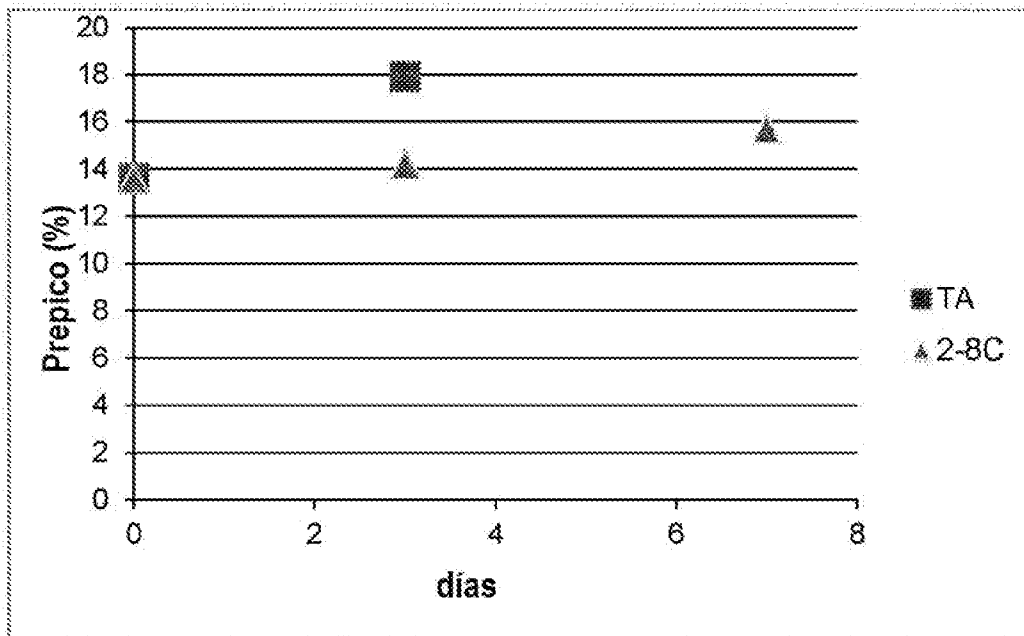


Figura 3B

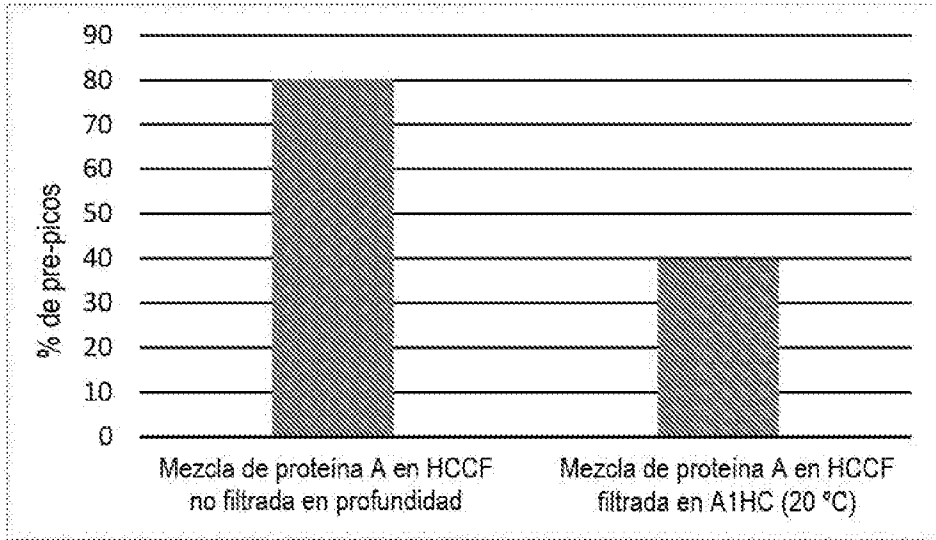


Figura 4A

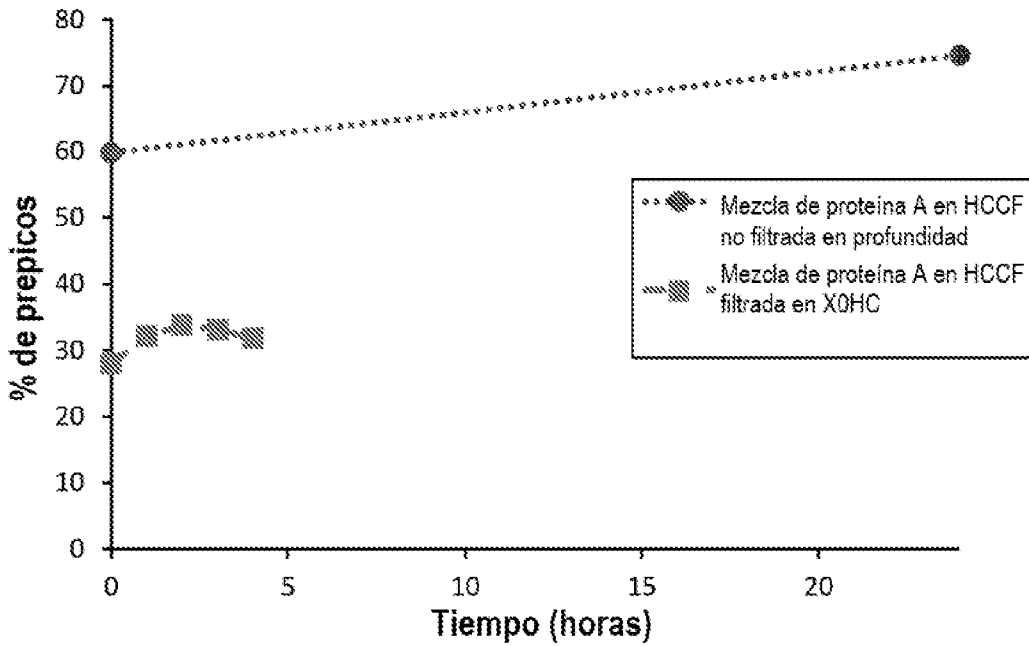


Figura 4B

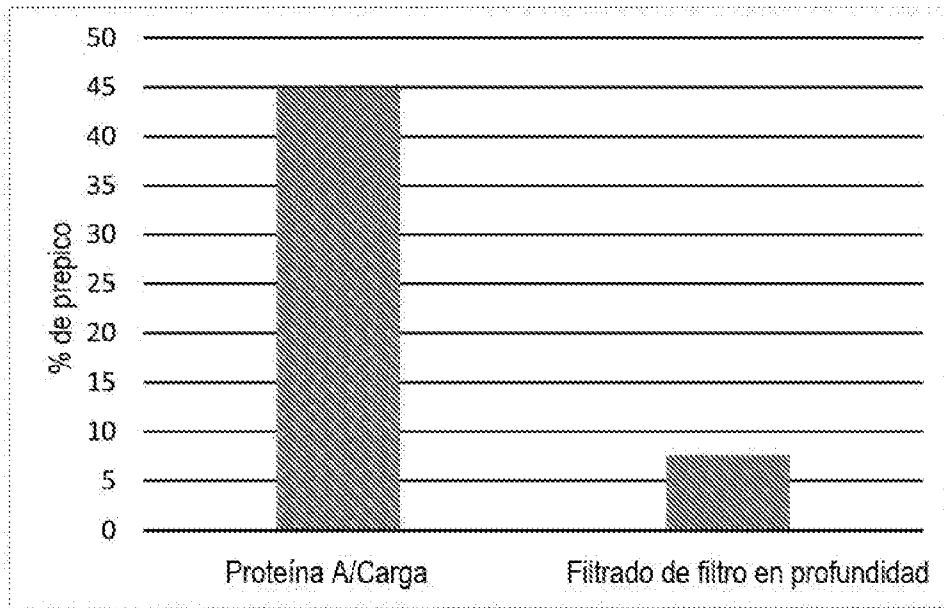


Figura 5A

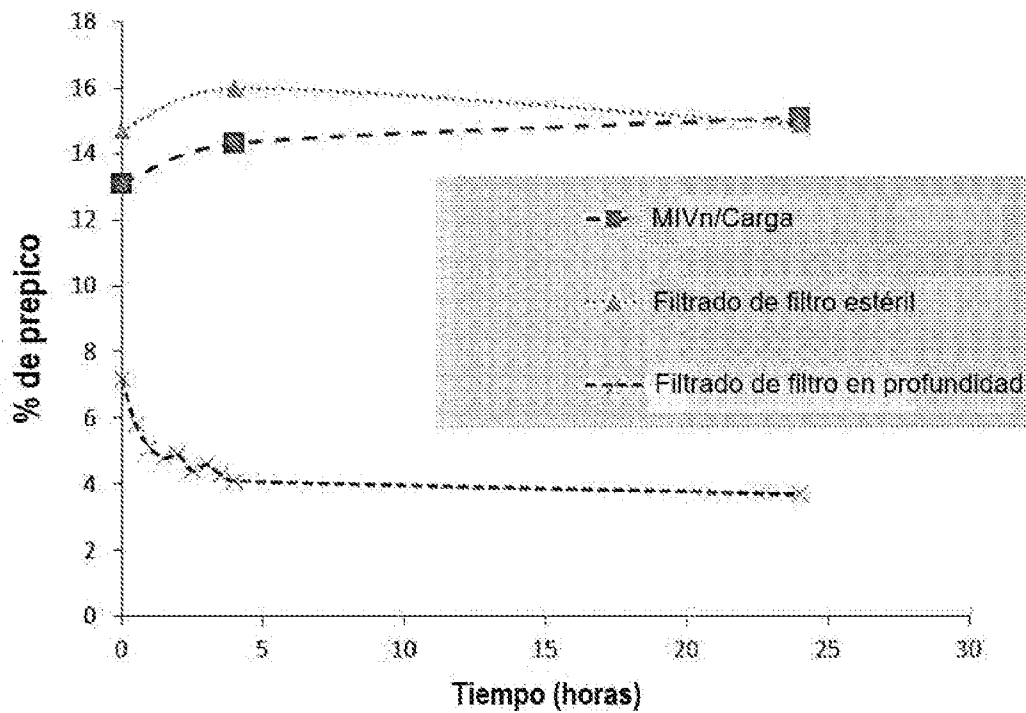


Figura 5B

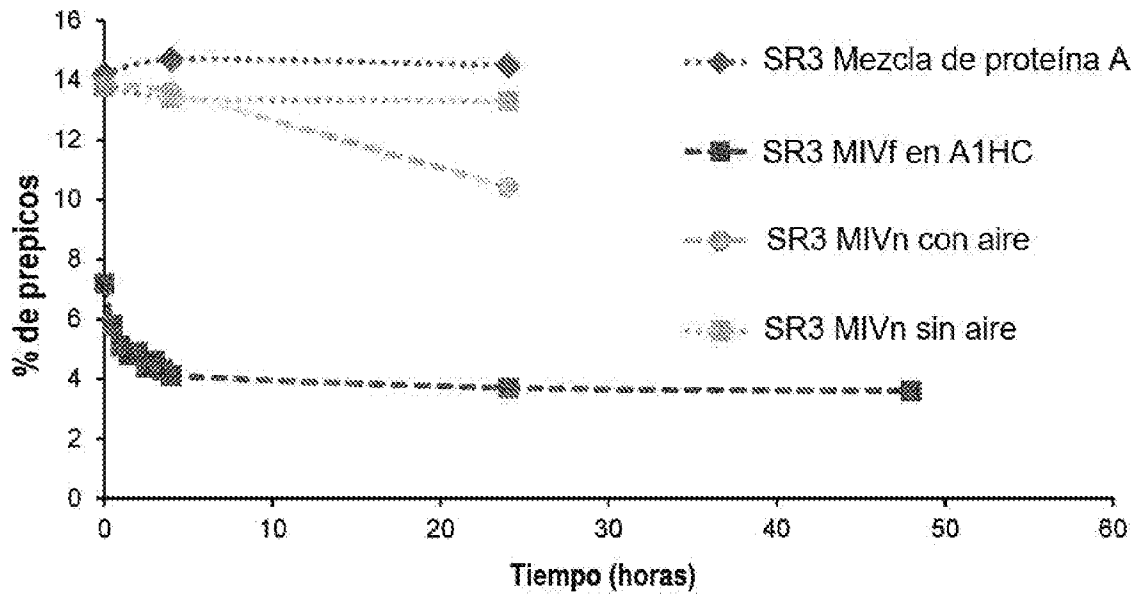


Figura 6

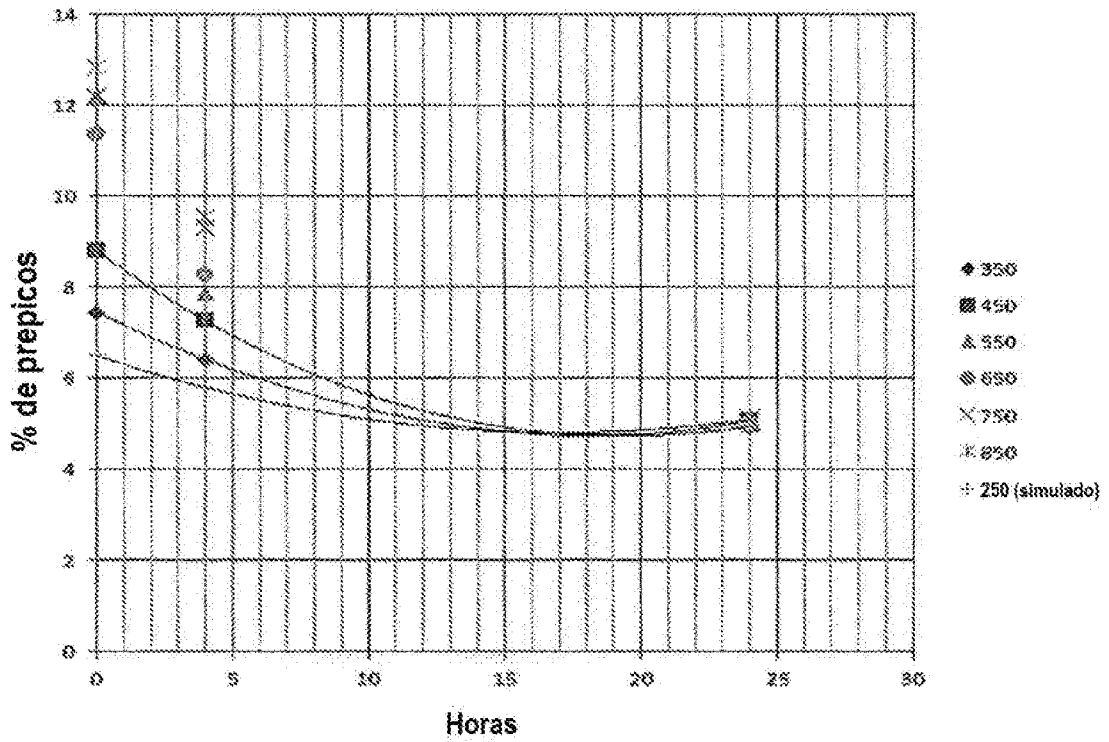


Figura 7A

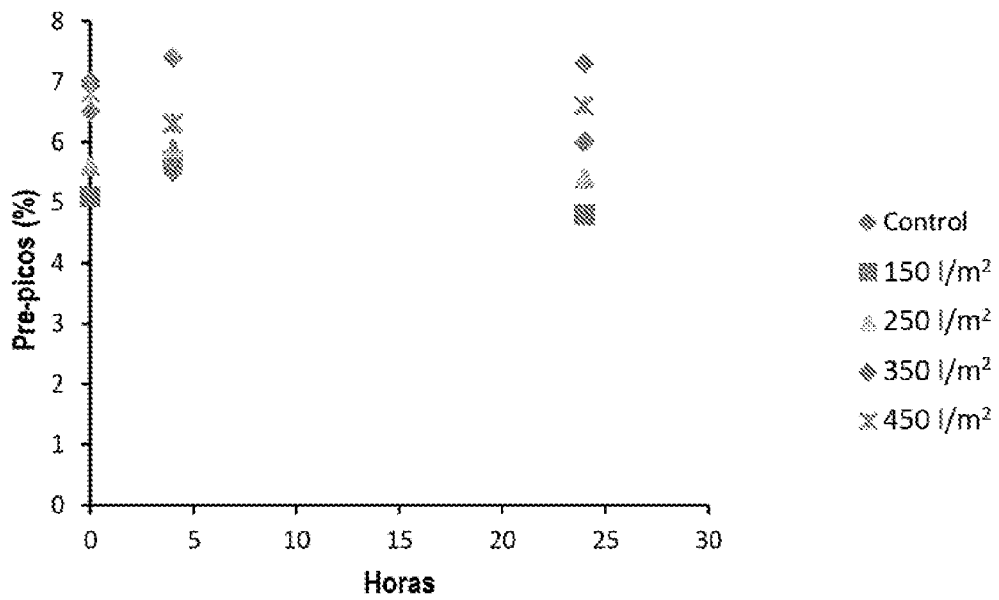


Figura 7B

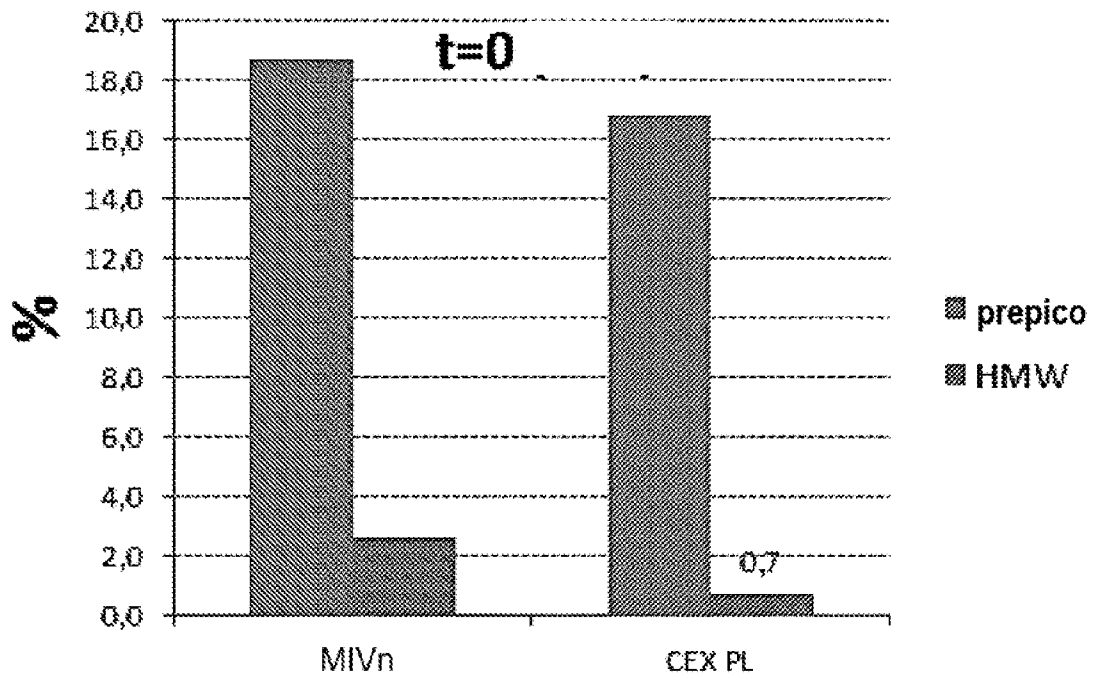


Figura 8A

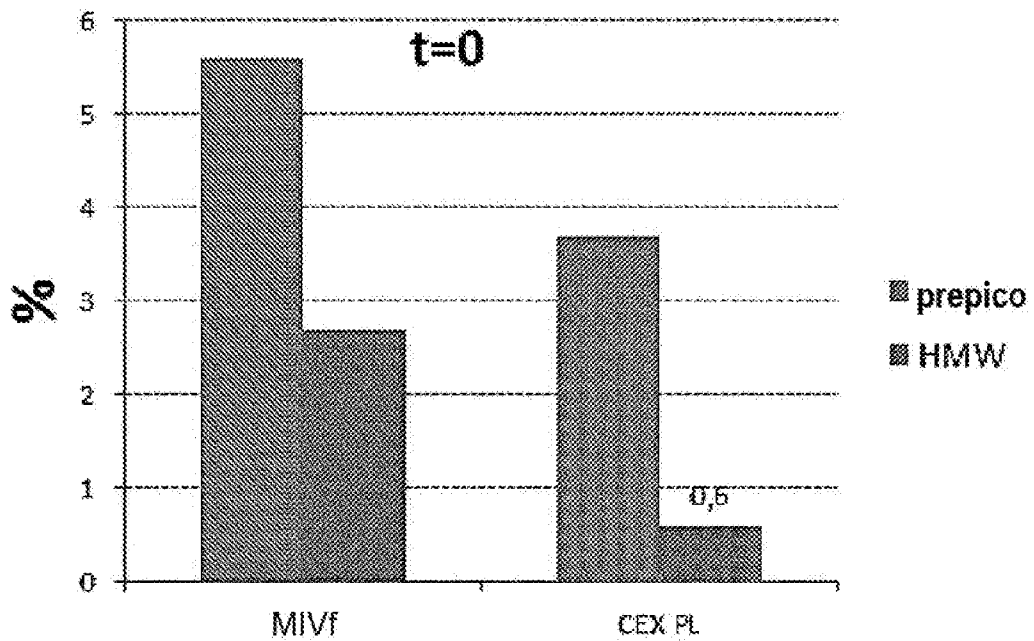


Figura 8B

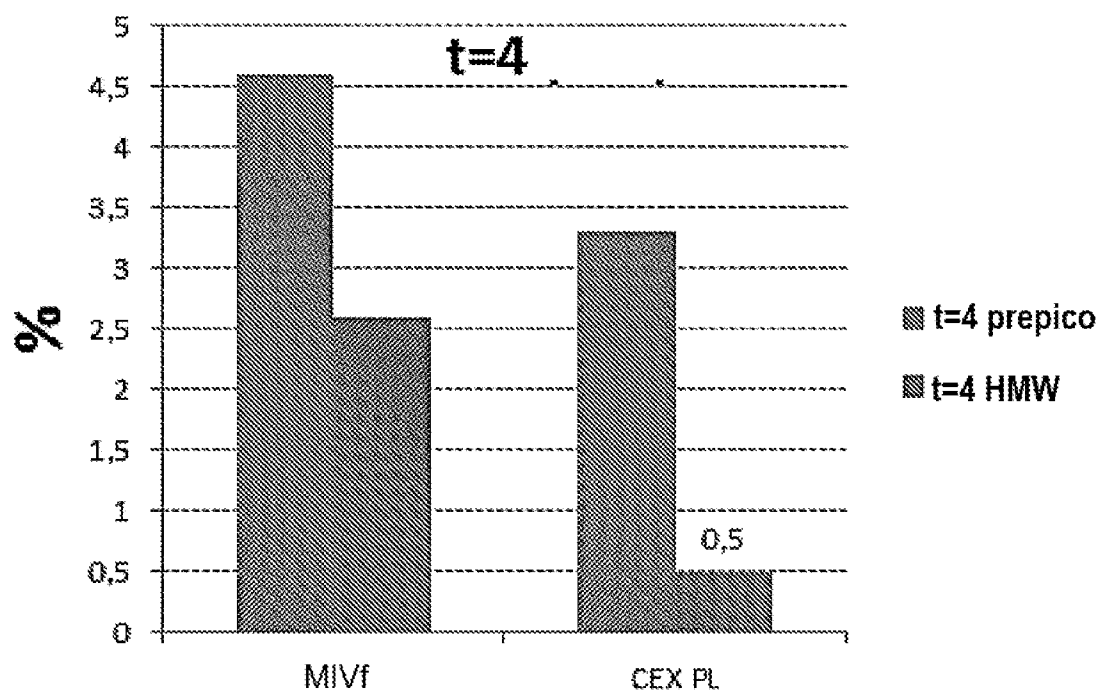


Figura 8C

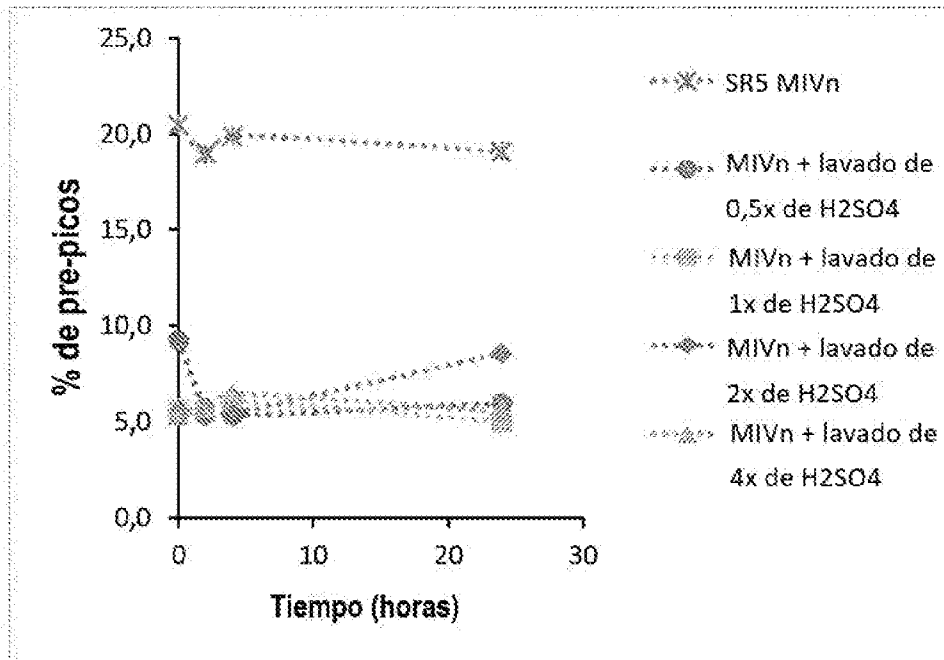


Figura 9A

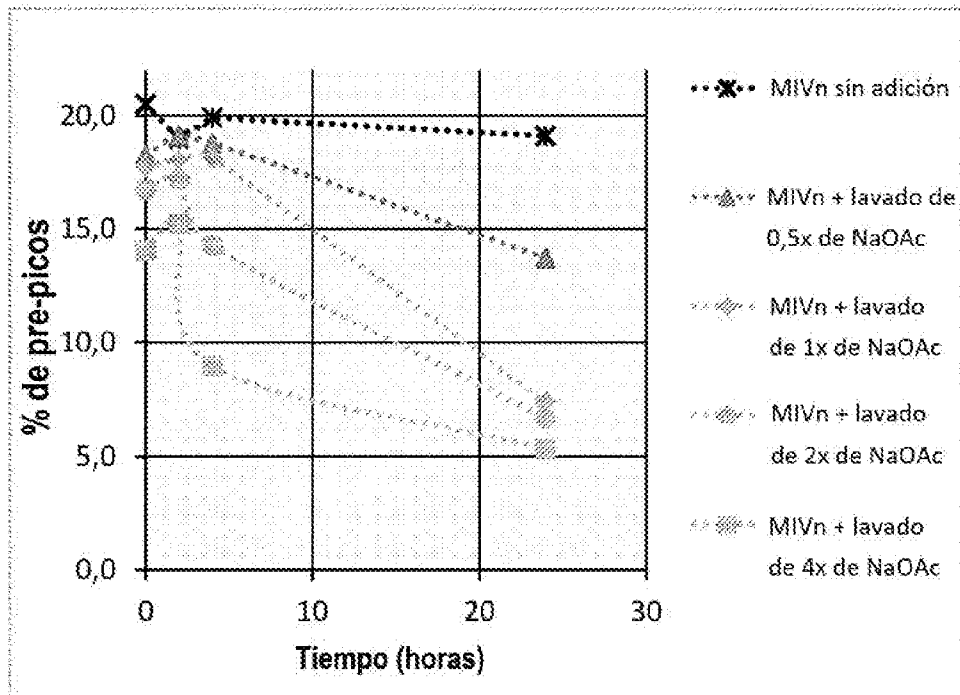


Figura 9B