

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 936 088**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/34** (2006.01)

**C07K 16/06** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2016** **PCT/US2016/023746**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016** **WO16154290**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2016** **E 16716341 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2022** **EP 3274359**

54 Título: **Filtración de virus**

30 Prioridad:

**23.03.2015 US 201562137187 P**

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

**14.03.2023**

73 Titular/es:

**ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**100 College Street**  
**New Haven, CT 06510, US**

72 Inventor/es:

**OLSON, BIANCA;**  
**RAJENDRAN, SARAVANAMOORTHY y**  
**TEDSTONE, RYAN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 936 088 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 de virus

## CAMPO TÉCNICO

5 Esta invención se refiere en general a métodos para purificar proteínas recombinantes, y a métodos para fabricar productos de proteínas recombinantes, y más específicamente, a métodos para llevar a cabo la filtración viral.

## ANTECEDENTES

10 Las proteínas recombinantes, tales como los anticuerpos monoclonales (mAb), son una clase importante y valiosa de productos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades, tales como la hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) y el síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS). Para producir la proteína recombinante, a menudo se usan células de mamífero que incluyen un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante. A continuación, la proteína recombinante se purifica a partir del cultivo de células de mamífero usando un procedimiento que puede incluir hacer pasar a través de un filtro de virus un fluido que incluye la proteína recombinante. Estos procedimientos de purificación a menudo experimentan caudales lentos y/o se ensucian debido a la obstrucción de un filtro de virus en el procedimiento. El caudal lento y/o el ensuciamiento de un filtro de virus en un procedimiento de purificación pueden dar como resultado la pérdida de proteína recombinante, puede afectar negativamente la seguridad del producto de proteína recombinante resultante, y/o reducir la eficiencia del procedimiento de purificación.

15 El documento EP2275033 describe un método para fabricar un fármaco proteico libre de virus, que comprende una etapa de filtración consistente en filtrar una disolución proteica que contiene virus a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a baja presión para obtener una disolución proteica libre de virus.

## SUMARIO

20 La presente descripción se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que un método para llevar a cabo la filtración viral que incluye una o más etapas de (por ejemplo, dos, tres o cuatro) prefiltrar un fluido que incluye un anticuerpo recombinante (por ejemplo, usando un prefiltro Sartorius Virosart® Max), ajustar el pH de un fluido que incluye un anticuerpo recombinante, añadir un agente estabilizante a un fluido que incluye un anticuerpo recombinante, y ajustar la concentración de cloruro de sodio en un fluido que incluye un anticuerpo recombinante, antes de hacer pasar el fluido a través de un filtro de virus, tiene un rendimiento sustancialmente mejorado en comparación con los métodos para llevar a cabo la filtración viral que no incluyen estas uno o más etapas, antes de hacer pasar el fluido a través de un filtro de virus.

30 En vista de este descubrimiento, la invención proporciona métodos para llevar a cabo la filtración viral, que incluyen ajustar el pH de un fluido que incluye un anticuerpo recombinante entre alrededor de 5,0 y 6,7, y añadir un agente estabilizante al fluido que incluye el anticuerpo recombinante en una cantidad suficiente para producir una concentración final de entre 0,1 mM y alrededor de 25 mM de agente estabilizante en el fluido y antes de hacer pasar el fluido a través de un filtro de virus, en el que el agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en arginina, alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, leucina, lisina, histidina, glicina, sacarosa, trehalosa, manitol, y sorbitol, y el anticuerpo recombinante comprende: una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1, una CDR2 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2, y una CDR3 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3; y una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 6, una CDR2 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 7, y una CDR3 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 8.

40 Los métodos de fabricación o purificación de un anticuerpo recombinante pueden incluir los métodos de filtración viral descritos aquí. Los métodos de filtración viral se pueden llevar a cabo como un procedimiento a gran escala, o como parte de un procedimiento a gran escala.

45 Los métodos para llevar a cabo la filtración viral de acuerdo con la invención incluyen: (a) ajustar (por ejemplo, aumentar o disminuir) el pH de un fluido que incluye un anticuerpo recombinante entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,7 (por ejemplo, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,5, entre alrededor de alrededor de 5,0 y alrededor de 6,0, o entre alrededor de 5,5 y alrededor de 6,0); y (b) hacer pasar el fluido a través de un filtro de virus para producir un filtrado que incluya el anticuerpo recombinante. Los métodos incluyen además, antes de (b): añadir un agente estabilizante al fluido en una cantidad suficiente para producir una concentración final entre alrededor de 0,1 mM y alrededor de 25 mM (por ejemplo, entre alrededor de 0,1 mM y alrededor de 24 mM, entre alrededor de 0,1 mM y alrededor de 24 mM, entre alrededor de 0,1 mM y alrededor de 22 mM, entre alrededor de 0,1 mM y alrededor de 20 mM, entre alrededor de 0,1 mM y alrededor de 10 mM, o entre alrededor de 0,1 mM y alrededor de 5 mM) de agente estabilizante en el fluido. El agente estabilizante se selecciona del grupo de: arginina (por ejemplo, L-arginina o L-arginina HCl), alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, leucina, lisina, histidina, glicina, sacarosa, trehalosa, manitol y sorbitol.

55 Algunas realizaciones de los métodos incluyen además, inmediatamente antes de (b): hacer pasar el fluido a través de un prefiltro (por ejemplo, un filtro que incluye una membrana de poliamida o un filtro de profundidad (por ejemplo,

un filtro de profundidad que incluye un medio de filtración poroso que es aniónico y/o hidrófobo)). En algunas realizaciones de los métodos, el fluido incluye además entre alrededor de 5 mM y alrededor de 300 mM (por ejemplo, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 300 mM, alrededor de 100 mM y alrededor de 300 mM, o alrededor de 100 mM y alrededor de 250 mM) de cloruro de sodio. En algunas realizaciones de los métodos, antes de (a), el pH del fluido está entre alrededor de 7,4 y alrededor de 7,8 (por ejemplo, entre alrededor de 7,5 y alrededor de 7,7, o alrededor de 7,6).

En algunas realizaciones de los métodos, el filtro de virus incluye una membrana de polietersulfona (PES), una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (por ejemplo, una membrana de PVDF que es una membrana de fibra hueca), o una membrana de celulosa regenerada con cupramonio (por ejemplo, una membrana de celulosa regenerada con cupramonio que es una membrana de fibra hueca).

En los métodos, antes de (a), el fluido puede incluir entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 25 mg/ml (por ejemplo, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 15 mg/ml, entre alrededor de 1 mg/ml y alrededor de 15 mg/ml, o entre alrededor de 5 mg/ml y alrededor de 15 mg/ml) de anticuerpo recombinante. En los métodos, el fluido puede incluir entre alrededor de 55 mM y alrededor de 90 mM (por ejemplo, alrededor de 65 mM) de cloruro de sodio.

En los métodos, el anticuerpo recombinante comprende: una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1, una CDR2 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2, y una CDR3 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3; una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 6, una CDR2 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 7, y una CDR3 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones de los métodos, el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones de los métodos, el anticuerpo recombinante comprende una cadena pesada que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones de los métodos, el anticuerpo recombinante comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones de los métodos, el anticuerpo recombinante comprende una cadena ligera que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 10.

El anticuerpo recombinante se une específicamente a la proteína C5 del complemento humano.

Como se usa aquí, la palabra “un” antes de un sustantivo representa uno o más del sustantivo particular. Por ejemplo, la frase “un agente estabilizante” representa “uno o más agentes estabilizantes”.

La expresión “célula de mamífero” significa cualquier célula de o derivada de cualquier mamífero (por ejemplo, un ser humano, un hámster, un ratón, un mono verde, una rata, un cerdo, una vaca, o un conejo). Por ejemplo, una célula de mamífero puede ser una célula inmortalizada. La célula de mamífero puede ser una célula diferenciada o indiferenciada. Se describen aquí ejemplos no limitativos de células de mamífero. En la técnica se conocen ejemplos adicionales de células de mamífero.

La expresión “sustancialmente libre” significa una composición (por ejemplo, un filtrado) que es al menos o alrededor de 90% libre, tal como al menos o alrededor de 95%, 96%, 97%, 98%, o al menos o alrededor de 99% libre, o alrededor de 100% libre de una sustancia específica, tales como agregados de anticuerpos solubles o proteínas de células hospedantes.

El término “cultivo” o “cultivo de células” significa mantenimiento o proliferación de una célula de mamífero bajo un conjunto controlado de condiciones físicas.

La expresión “cultivo de células de mamífero” significa un medio de cultivo (tal como un medio de cultivo líquido) que incluye una pluralidad de células de mamífero que se mantiene o prolifera bajo un conjunto controlado de condiciones físicas.

La expresión “medio de cultivo líquido” significa un fluido que incluye suficientes nutrientes para permitir que una célula (tal como una célula de mamífero) crezca o prolifere *in vitro*. Un medio de cultivo líquido puede incluir, por ejemplo, uno o más de: aminoácidos (tales como 20 aminoácidos), una purina (tal como hipoxantina), una pirimidina (tal como timidina), colina, inositol, tiamina, ácido fólico, biotina, calcio, niacinamida, piridoxina, riboflavina, timidina, cianocobalamina, piruvato, ácido lipoico, magnesio, glucosa, sodio, potasio, hierro, cobre, zinc, y bicarbonato de sodio. En algunos ejemplos, un medio de cultivo líquido puede incluir suero de un mamífero. En algunos ejemplos, un medio de cultivo líquido no incluye suero u otro extracto de un mamífero (un medio de cultivo líquido definido). Un medio de cultivo líquido también puede incluir metales en trazas, una hormona de crecimiento de mamíferos, y/o un factor de crecimiento de mamíferos. Un ejemplo de medio de cultivo líquido es el medio mínimo (tal como un medio que incluye solo sales inorgánicas, una fuente de carbono, y agua). Se describen aquí ejemplos no limitativos de medio de cultivo líquido. En la técnica se conocen ejemplos adicionales de medio de cultivo líquido, y están disponibles comercialmente. Un medio de cultivo líquido puede incluir cualquier densidad de células de mamífero. Por ejemplo, como se usa aquí, un volumen de medio de cultivo líquido retirado de un recipiente (tal como un biorreactor) puede estar sustancialmente libre de células de mamífero.

El término “anticuerpo” significa un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos de al menos 10 aminoácidos (tal como al menos 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos) de una proteína inmunoglobulina (tal como

una secuencia de dominio variable, una secuencia marco, o una secuencia de dominio constante de una inmunoglobulina de cadena ligera o pesada). Un anticuerpo puede ser, por ejemplo, una IgG, IgE, IgD, IgA o IgM. El anticuerpo puede ser cualquier subclase de IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o la IgG2/4 quimérica, como se encuentra en eculizumab. El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, tal como un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, o un fragmento scFv. El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo triespecífico, o un anticuerpo dímero, trímero o multímero, o un diacuerpo, un AFFIBODY®, o un NANOBODY®. El anticuerpo puede ser una proteína modificada por ingeniería genética que incluya al menos un dominio de inmunoglobulina (tal como una proteína de fusión que incluya un dominio Fc). El anticuerpo puede ser una proteína modificada por ingeniería genética que tenga cuatro dominios de unión al anticuerpo, tal como DVD-Ig y CODV-Ig. Véanse, por ejemplo, los documentos US2007/0071675 y WO2012/135345. Se describen aquí ejemplos no limitativos de anticuerpos, y en la técnica se conocen ejemplos adicionales de anticuerpos.

El término "capturar" significa una etapa realizada para purificar o aislar parcialmente (tal como al menos o alrededor de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, o al menos o alrededor de 99% de pureza en peso), concentrar y/o estabilizar un anticuerpo recombinante a partir de uno o más componentes presentes en un fluido que incluye el anticuerpo recombinante. Otros componentes pueden incluir amortiguadores, sales, ADN, ARN, proteínas de la célula hospedante, y agregados del anticuerpo recombinante deseado presente o segregado por una célula de mamífero. La captura se puede llevar a cabo usando una resina de cromatografía que se une a un anticuerpo recombinante mediante el uso de una interacción específica de reconocimiento y unión, tal como con la cromatografía de proteína A o usando la cromatografía de antígeno. Se describen aquí métodos no limitativos para capturar un anticuerpo recombinante de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante o un medio de cultivo líquido clarificado, y otros son conocidos en la técnica. Un anticuerpo recombinante se puede capturar de un medio de cultivo líquido usando al menos una columna de cromatografía (tal como cualquiera de las columnas de cromatografía descritas aquí, tal como una columna de cromatografía rellena con una resina de cromatografía de afinidad, una resina de cromatografía de intercambio aniónico, una resina de cromatografía de intercambio catiónico, una resina de cromatografía de modo mixto, una resina de cromatografía de tamiz molecular, o una resina de cromatografía de interacción hidrófoba). La captura se puede llevar a cabo usando una resina de cromatografía que utiliza un mecanismo de captura de unión a proteína A, un mecanismo de captura de unión a anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o un mecanismo de captura de unión a antígeno.

El término "purificar" significa un método o etapa realizados para aislar un anticuerpo recombinante de una o más impurezas o componentes presentes en un fluido que incluye un anticuerpo recombinante. Los componentes que se separan incluyen proteínas del medio de cultivo líquido, proteínas de la célula hospedante, agregados del anticuerpo recombinante deseado, ADN, ARN, otras proteínas, endotoxinas, y virus presentes o segregados por una célula de mamífero. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una etapa de purificación antes o después de una etapa de captura inicial y/o antes o después de una etapa de hacer pasar un anticuerpo recombinante a través de un filtro de profundidad o un prefiltro y/o un filtro de virus. Se puede llevar a cabo una etapa de purificación usando una resina, una membrana, o cualquier otro soporte sólido que se una a un anticuerpo recombinante o a contaminantes (tal como mediante el uso de cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, resina de cromatografía de modo mixto, o cromatografía de tamiz molecular). Un anticuerpo recombinante se puede purificar a partir de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante usando al menos una columna cromatográfica y/o una membrana cromatográfica (tal como cualquiera de las columnas cromatográficas descritas aquí).

El término "pulido" es un término de la técnica, y significa una etapa realizada para eliminar las trazas restantes o pequeñas cantidades de contaminantes o impurezas de un fluido que incluye un anticuerpo recombinante que está cerca de una pureza final deseada. Por ejemplo, el pulido se puede llevar a cabo haciendo pasar un fluido que incluye el anticuerpo recombinante a través de una columna o columnas cromatográficas o absorbente o absorbentes de membrana que se unen selectivamente al anticuerpo recombinante o a pequeñas cantidades de contaminantes o impurezas restantes presentes en el fluido, incluido el anticuerpo recombinante. En tal ejemplo, el eluato/filtrado de la o las columnas cromatográficas o absorbente o absorbentes de membrana incluye el anticuerpo recombinante. Como se describe aquí, se pueden llevar a cabo una o más operaciones unitarias de pulido antes de hacer pasar un fluido que incluye el anticuerpo recombinante a través de un filtro de virus.

El término "filtrado" es un término técnico, y significa un fluido que se emite desde un filtro (por ejemplo, un filtro de profundidad, un prefiltro, o un filtro de virus) que incluye una cantidad detectable de un anticuerpo recombinante.

El término "filtración" significa la eliminación de al menos una parte (tal como al menos el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de contaminantes biológicos no deseados (tales como células de mamífero, bacterias, levaduras células, virus, micobacterias, o micoplasmas), impurezas (tales como agregados de anticuerpos solubles, proteínas de células hospedantes, ADN de células hospedantes, y otras sustancias químicas usadas en un método para purificar un anticuerpo recombinante o un método para fabricar un anticuerpo recombinante), y/ o material en partículas (tales como anticuerpos precipitados) de un fluido (tal como un medio de cultivo líquido o fluido presente en cualquiera de los procedimientos descritos aquí).

La expresión "filtración viral" significa la eliminación de al menos una parte (tal como al menos el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de virus de un fluido (por ejemplo, tal como un medio de cultivo líquido o fluido presente en cualquiera

de los procedimientos descritos aquí) que incluye un anticuerpo recombinante. Los métodos para llevar a cabo la filtración viral se describen aquí.

La expresión “filtro de virus” se refiere a un filtro capaz de eliminar al menos una parte (tal como al menos el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o 100%) de virus de un fluido (por ejemplo, tal como un medio de cultivo líquido o fluido presente en cualquiera de los procedimientos descritos aquí) que incluye un anticuerpo recombinante cuando el fluido fluye a través del filtro. Se describen aquí ejemplos no limitativos de filtros de virus. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de filtros de virus.

El término “prefiltro” es un filtro capaz de eliminar al menos una parte de (tal como al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o 100% de agregados de proteínas solubles y/o partículas de un fluido (por ejemplo, tal como un medio de cultivo líquido o fluido presente en cualquiera de los procedimientos descritos aquí) cuando el fluido fluye a través del prefiltro. Se puede hacer pasar un fluido, por ejemplo a través de un prefiltro, antes de hacer pasar el fluido a través de un filtro de virus. Se describen aquí ejemplos no limitativos de prefiltros. En la técnica se conocen ejemplos adicionales de prefiltros.

La expresión “anticuerpo segregado” o “anticuerpo recombinante segregado” se refiere a un anticuerpo (tal como un anticuerpo recombinante) que originalmente incluía al menos una secuencia señal de secreción cuando se traduce dentro de una célula de mamífero y, al menos en parte, a través de la escisión enzimática de la secuencia señal de secreción en la célula de mamífero, se segrega al menos parcialmente en el espacio extracelular (tal como un medio de cultivo líquido). Los profesionales expertos apreciarán que un anticuerpo “segregado” no necesita disociarse completamente de la célula para ser considerado un anticuerpo segregado.

La expresión “medio de cultivo líquido clarificado” se refiere a un medio de cultivo líquido obtenido de un cultivo de células de levadura, bacterias o mamíferos que está sustancialmente libre (tal como al menos 90%, 92%, 94%, 96%, 98% o 99% libre) de células de mamíferos, bacterias o levaduras. Un medio de cultivo líquido clarificado, por ejemplo, se puede preparar filtrando un cultivo celular (tal como filtración tangencial alternante o filtración de flujo tangencial), centrifugando un cultivo celular y recolectando el sobrenadante, o permitiendo que las células del cultivo celular se asienten y obteniendo un fluido que esté sustancialmente libre de células. Las células también se pueden separar del medio mediante el uso de un dispositivo de separación de células, tal como el sistema ATF de Refine Technology.

La purificación o fabricación de anticuerpos recombinantes normalmente requiere la realización en serie de múltiples operaciones o etapas de purificación independientes. La expresión “operación unitaria” es un término técnico, y se refiere a una etapa discreta o miniprocedimiento realizado en un procedimiento general más grande para purificar un anticuerpo recombinante o un método para fabricar un anticuerpo recombinante (tal como un método para fabricar un anticuerpo recombinante a partir de un medio de cultivo líquido clarificado). Por ejemplo, una unidad de operación puede ser una etapa de captura del anticuerpo recombinante, ultrafiltración/diafiltración para concentrar el anticuerpo recombinante en un fluido, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, pulido del anticuerpo recombinante, inactivación viral, filtración viral, prefiltración, ajuste de pH, ajuste de fuerza iónica, y ajuste tanto de pH como de fuerza iónica de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante.

La expresión “filtro de profundidad” es un término técnico, y significa un filtro que incluye un medio de filtración poroso que captura contaminantes y/o impurezas (tal como cualquiera de los contaminantes y/o impurezas descritos aquí) dentro de su estructura tridimensional y no meramente en la superficie. Los filtros de profundidad se caracterizan porque retienen los contaminantes o impurezas dentro del filtro, y pueden retener una cantidad relativamente grande antes de obstruirse. La construcción del filtro de profundidad puede incluir múltiples capas, múltiples membranas, una sola capa, o un material de resina. Los ejemplos no limitativos de filtros de profundidad incluyen filtros CUNO® Zeta PLUS® Delipid (3M, St. Paul, MN), filtros CUNO® Emphaze AEX (3M, St. Paul, MN), filtros CUNO® 90ZA08A (3M, St. Paul, MN), filtros CUNO® 90ZB08A (3M, St. Paul, MN), filtros CUNO® DELI08A Delipid (3M, St. Paul, MN), filtros CUNO® DELIP08A Delipid plus (3M, St. Paul, MN), filtros Millipore XOH (EMD Millipore, Billerica, MA), almohadillas MILLISTAK® (EMD Millipore, Billerica, MA).

La expresión “agregados de proteínas solubles” es un término de la técnica, y significa complejos de dos o más proteínas (tales como anticuerpos recombinantes) que son solubles en un fluido. Tales complejos pueden formarse a través de interacciones hidrofóbicas y/o iónicas entre moléculas de proteínas recombinantes individuales o fragmentos de las mismas.

La expresión “agente estabilizante” es un agente que reduce el radio hidrodinámico de un anticuerpo recombinante en un fluido y/o minimiza el nivel de agregados de proteínas solubles y/o insolubles (por ejemplo, agregados de anticuerpos recombinantes solubles y/o insolubles y/o agregados de proteínas de células hospedantes solubles y/o insolubles) en un fluido que incluye una proteína recombinante. Se describen aquí ejemplos no limitativos de agentes estabilizantes. En la técnica se conocen ejemplos adicionales de agentes estabilizantes.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos usados aquí tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Los métodos y materiales se describen aquí para uso en la presente invención; también se pueden usar otros métodos y materiales adecuados

conocidos en la técnica. La invención está definida por las reivindicaciones, y los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y figuras, y de las reivindicaciones.

## 5 DESCRIPCIÓN DE DIBUJOS

La Figura 1 es un gráfico que muestra la caída del flujo en comparación con el rendimiento de un filtro de virus Virosart® CPV cuando un líquido que contiene entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y tiene un pH de entre 5,5 y 7,6, se hace pasar por el filtro. Cada fluido que se pasó por el filtro de virus Virosart® CPV se había prefiltrado primero con un filtro de 0,1 µm o un prefiltro Sartorius Virosart® Max.

La Figura 2 es una tabla que muestra el rendimiento de un filtro de virus Virosart® CPV en el punto de tiempo en el que se observó una caída del flujo del 50% cuando un líquido que incluye entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y que tiene un pH de entre 5,5 y 7,6, se hace pasar por el filtro. Cada fluido que se pasó por el filtro de virus Virosart® CPV se había filtrado previamente usando un filtro de 0,1 µm o un prefiltro Sartorius Virosart® Max.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la relación del rendimiento del filtro de virus Virosart® CPV en el momento en el que se observó una caída del flujo del 50% cuando los fluidos que incluían entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y que tienen un pH de entre 5,5 y 7,6, que se han prefiltrado con un filtro de 0,1 µm o prefiltro Sartorius Virosart® Max, se hacen pasar por el filtro de virus Virosart® CPV, al rendimiento previsto a una caída del flujo del 50% para un filtro de virus Virosart® CPV mediante análisis estadístico.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la importancia de diferentes parámetros en el rendimiento del filtro de virus Virosart® CPV en el momento en el que se observa una caída del flujo del 50% (derivado de datos recopilados haciendo pasar fluidos, que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y con un pH de entre 5,5 y 7,6, que han sido prefiltrados con un 0,1 µm o prefiltro Sartorius Virosart® Max, a través de un filtro de virus Virosart® CPV).

La Figura 5 es un gráfico que muestra el rendimiento a una caída del flujo del 50% para un filtro de virus Virosart® CPV para fluidos que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y que tienen un pH de entre 5,5 y 7,6, que se prefiltraron usando un filtro de 0,1 µm (barra izquierda) o un prefiltro Sartorius Virosart® Max (barra derecha).

La Figura 6 es un gráfico que muestra la relación del rendimiento a una caída del flujo del 50% para un filtro de virus Virosart® CPV para fluidos que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y que tienen un pH de entre 5,5 y 7,6, que se prefiltraron con un filtro de 0,1 µm o con un prefiltro Sartorius Virosart® Max, al radio hidrodinámico del anticuerpo monoclonal humano BNJ441 medido en cada fluido.

La Figura 7 es un gráfico que muestra el rendimiento medio a una caída del flujo del 50% para un filtro de virus Virosart® CPV para fluidos que tienen un pH de 5,5, 6,5 o 7,5, y que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y los fluidos se han prefiltrado usando un filtro de 0,1 µm o un prefiltro Sartorius Virosart® Max.

La Figura 8 es un gráfico que muestra la relación del rendimiento a una caída del flujo del 50% para un filtro de virus Virosart® CPV para fluidos que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y que tienen un pH de entre 5,5 y 7,6, que se prefiltraron con un filtro de 0,1 µm o con un prefiltro Sartorius Virosart® Max, a la cantidad de L-arginina presente en cada fluido.

La Figura 9 es un gráfico que muestra la relación del rendimiento a una caída del flujo del 50% para un filtro de virus Virosart® CPV para fluidos que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y que tienen un pH de entre 5,5 y 7,6, que se prefiltraron con un filtro de 0,1 µm o con un prefiltro Sartorius Virosart® Max, a la concentración de cloruro de sodio presente en cada fluido.

La Figura 10 es un gráfico que muestra la relación del rendimiento a una caída del flujo del 50% para un filtro de virus Virosart® CPV para fluidos que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y que tienen un pH de entre 5,5 y 7,6, que se prefiltraron usando un filtro de 0,1 µm o un prefiltro Sartorius Virosart® Max, al porcentaje de agregados proteicos solubles presentes en cada fluido.

La Figura 11 es un gráfico que muestra la relación del rendimiento a una caída del flujo del 50% para un filtro de virus Virosart® CPV para fluidos que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y que tienen un pH de entre 5,5 y 7,6, que se prefiltraron usando un filtro de 0,1 µm o un prefiltro Sartorius Virosart® Max, a la concentración media de partículas (número por ml de líquido).

La Figura 12 es un gráfico que muestra la relación entre el rendimiento a una caída del flujo del 50% para un filtro de virus Virosart® CPV para fluidos que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y que tienen un pH de entre 5,5 y 7,6, que se prefiltraron usando un filtro de 0,1 µm o un prefiltro Sartorius Virosart® Max; la concentración de cloruro de sodio en cada fluido; y el pH de cada fluido.

La Figura 13 es un gráfico que muestra la relación entre el porcentaje de agregados de proteínas solubles presentes en fluidos que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y con un pH de entre 5,5 y 7,6, que se prefiltraron usando un filtro de 0,1 µm o un prefiltro Virosart Sartorius® Max; la concentración de cloruro de sodio en cada fluido; y el pH de cada fluido.

La Figura 14 es un gráfico que muestra la relación entre el rendimiento a una caída del flujo del 50% para un filtro de virus Virosart® CPV para fluidos prefiltrados con un filtro de 0,1 µm o un prefiltro Sartorius Virosart® Max, y que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina; el pH de cada fluido; y la concentración de cloruro de sodio en cada fluido.

La Figura 15 es un gráfico que muestra la relación entre el radio hidrodinámico del anticuerpo monoclonal humano BNJ441 en fluidos que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM de L-arginina, y con un pH de entre 5,5 y 7,6, que se prefiltraron previamente con un filtro de 0,1 µm o con un prefiltro Sartorius Virosart® Max; el pH de cada fluido; y la concentración de cloruro de sodio de cada fluido.

La Figura 16 es un gráfico que muestra la relación entre el radio hidrodinámico del anticuerpo monoclonal humano BNJ441 en fluidos que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM L-arginina, y con un pH de entre 5,5 y 7,6, que se prefiltraron previamente con un filtro de 0,1 µm o con un prefiltro Sartorius Virosart® Max; el pH de cada fluido; y el rendimiento a una caída del flujo del 50% cuando cada fluido se hace pasar a través de un filtro de virus Virosart® CPV.

La Figura 17 es un gráfico que muestra la relación entre el porcentaje de agregados de anticuerpo monoclonal humano BNJ441 en fluidos que incluyen entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441, entre 65 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y 0 o 50 mM L-arginina, y con un pH de entre 5,5 y 7,6, que se prefiltraron previamente con un filtro de 0,1 µm o con un prefiltro Sartorius Virosart® Max; la concentración de cloruro de sodio en cada fluido; y el rendimiento a una caída del flujo del 50% cuando cada fluido se hace pasar a través de un filtro de virus Virosart® CPV.

La Figura 18 es un gráfico que muestra la concentración mínima de agente estabilizante necesaria para lograr un rendimiento del filtro de virus Virosart® CPV de 750 g/m<sup>2</sup> o superior para un fluido que tenga un pH de entre 5,5 y 7,6, y que incluya entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441.

La Figura 19 es un gráfico que muestra el flujo en comparación con el rendimiento cuando un fluido que incluye 4 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441 y 65 mM de cloruro de sodio, y que tiene un pH de 7,0, se hizo pasar a través de un filtro de virus Asahi Planova® BioEx.

La Figura 20 es un gráfico que muestra el flujo en comparación con el rendimiento cuando un fluido que incluye 4 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441 y cloruro de sodio 65 mM, y que tiene un pH de 7,75, se hizo pasar a través de un filtro de virus Asahi Planova® BioEx.

La Figura 21 es un gráfico que muestra el flujo en comparación con el rendimiento cuando un fluido que incluye 4 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441 y cloruro de sodio 65 mM, y que tiene un pH de 8,5, se hizo pasar a través de un filtro de virus Asahi Planova® BioEx.

La Figura 22 es un gráfico que muestra la caída del flujo en comparación con el rendimiento cuando un fluido que incluye 4 mg/ml de anticuerpo monoclonal humano BNJ441 y 65 mM de cloruro de sodio, y que tiene un pH de 7,75, se hizo pasar a través de un filtro de virus Asahi Planova® 20N.

La Figura 23 es un gráfico que muestra la caída del flujo en comparación con el rendimiento cuando una variedad de fluidos que incluyen entre 5 mg/ml y 15 mg/ml de samalizumab y entre 75 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y que tienen un pH de 5,0, 5,5 o 6,0 se hicieron pasar a través de un filtro de virus Virosart® CPV.

La Figura 24 es un conjunto de tres gráficos que muestran la relación entre el rendimiento de una variedad de fluidos que incluyen entre 5 mg/ml y 15 mg/ml de samalizumab y entre 75 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y que tienen un pH de 5,0, 5,5 o 6,0 que se hicieron pasar a través de un filtro de virus Virosart® CPV y el pH de cada fluido (gráfico de la izquierda), la concentración de cloruro de sodio en cada fluido (gráfico del centro), y la concentración de samalizumab presente en cada fluido (gráfico de la derecha). Las relaciones se determinaron mediante análisis estadístico.

La Figura 25 es un gráfico que muestra la caída del flujo en comparación con el rendimiento cuando una variedad de fluidos que incluyen entre 9,3 mg/ml y 10 mg/ml de anticuerpo monoclonal BNJ383 y entre 80 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y que tienen un pH de entre 7,0 y 8,5, se hicieron pasar a través de un filtro de virus Virosart® CPV o un filtro de virus Virosart® HF.

La Figura 26 es un conjunto de dos gráficos que muestran la relación entre el rendimiento de una variedad de fluidos que incluyen entre 9,3 mg/ml y 10 mg/ml de anticuerpo monoclonal BNJ383 y entre 80 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y que tienen un pH de entre 7,0 y 8,5, que se hicieron pasar a través de un filtro de virus Virosart® CPV o un filtro Virosart® HF, y el pH de cada fluido (gráfico de la izquierda) y la concentración de cloruro de sodio en cada fluido (gráfico de la derecha). Las relaciones se determinaron mediante análisis estadístico.

La Figura 27 es un gráfico que muestra la caída del flujo en comparación con el rendimiento del fluido que incluye 7,1 mg/ml de ecilizumab, fosfato de sodio 20 mM, y cloruro de sodio 80 mM, y que tiene un pH de 6,5, que se había filtrado previamente con un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm y 0,5/0,1 µm, un prefiltro Sartorius Virosart® Max, un prefiltro Sartopore® 2, prefiltro Sartobind STIC®, prefiltro Sartobind® Q, prefiltro Sartobind® HIC Phenyl, o un prefiltro Sartobind® S, que se hizo pasar por un filtro de virus Virosart® CPV.

La Figura 28 es un gráfico que muestra el porcentaje de agregados de proteínas presentes en fluidos que incluyen 7,1 mg/ml de ecilizumab, fosfato de sodio 20 mM, y cloruro de sodio 80 mM, y que tienen un pH de 6,5, después de que el fluido se haya filtrado previamente con un filtro prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm y 0,5/0,1 µm, un prefiltro Sartorius Virosart® Max, un prefiltro Sartopore® 2, prefiltro Sartobind STIC®, prefiltro Sartobind® Q, prefiltro Sartobind® HIC Phenyl, o un prefiltro Sartobind® S, en comparación con el rendimiento de un filtro de virus Virosart® CPV cuando cada fluido se hace pasar por el filtro de virus Virosart® CPV.

La Figura 29 es un gráfico que muestra el número de partículas presentes en fluidos que incluyen 7,1 mg/ml de ecilizumab, fosfato de sodio 20 mM, y cloruro de sodio 80 mM, y que tienen un pH de 6,5, después de que el fluido se haya filtrado previamente con prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm y 0,5/0,1 µm, un prefiltro Sartorius Virosart® Max, un prefiltro Sartopore 2, un prefiltro Sartobind STIC, un prefiltro Sartobind Q, un prefiltro Sartobind HIC Phenyl, o un prefiltro Sartobind S, y antes de que cada fluido se haya hecho pasar posteriormente a través de un filtro de virus Virosart® CPV, en comparación con el rendimiento del filtro de virus Virosart® CPV cuando cada fluido se hace pasar por el filtro de virus Virosart® CPV.

La Figura 30 es un esquema que muestra los protocolos experimentales usados para llevar a cabo la prefiltración y la filtración con un filtro de virus Virosart® CPV en el Ejemplo 6.

La Figura 31 es un gráfico del porcentaje de caída del flujo en función de la capacidad de carga de un filtro de virus Virosart® CPV de tres lotes diferentes (Lotes A-C). El material cargado en cada filtro de virus Virosart® CPV se filtró previamente usando un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHC), y un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm (SHR). Se usó por duplicado un filtro de virus Virosart® CPV de cada lote.

La Figura 32 es un gráfico del flujo a lo largo del tiempo de un filtro de virus Virosart® CPV de tres lotes diferentes (Lotes A-C). El material cargado en cada filtro de virus Virosart® CPV se filtró previamente usando un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHC), y un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm (SHR). Se usó por duplicado un filtro de virus Virosart® CPV de cada lote.

La Figura 33 es un gráfico del porcentaje de caída del flujo en función de la capacidad de carga de un filtro de virus Virosart® CPV cargado con eluato producido usando un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHC) y un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHR) usados en una de dos condiciones diferentes: 622 l/m<sup>2</sup> (218 ml fluyeron a través de los SHC de 3,5 cm<sup>2</sup> y SHR de 3,5 cm<sup>2</sup>) o 311 l/m<sup>2</sup> (109 ml a través de los SHC de 3,5 cm<sup>2</sup> y SHR de 3,5 cm<sup>2</sup>).

La Figura 34 es un gráfico del flujo a lo largo del tiempo de un filtro de virus Virosart® CPV cargado con eluato producido usando un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHC) y un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHR) usados en una de dos condiciones diferentes: 622 l/m<sup>2</sup> (218 ml fluyeron a través de los SHC de 3,5 cm<sup>2</sup> y SHR de 3,5 cm<sup>2</sup>) o 311 l/m<sup>2</sup> (109 ml a través de los SHC de 3,5 cm<sup>2</sup> y SHR de 3,5 cm<sup>2</sup>).

La Figura 35 es un gráfico del porcentaje de caída del flujo en función de la capacidad de carga de un filtro de virus Virosart® CPV funcionando con una presión de alimentación de 15 psi o 30 psi. El material cargado en el filtro de virus Virosart® CPV en línea con un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHC), seguido de un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHR), o en línea con un prefiltro Sartorius Virosart® Max (5 cm<sup>2</sup>).

La Figura 36 es un gráfico del flujo a lo largo del tiempo de un filtro de virus Virosart® CPV funcionando con una presión de alimentación de 15 psi o 30 psi. El material se cargó en el filtro de virus Virosart® CPV en línea con un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm² (SHC), seguido de un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm de 3,5 cm² (SHR), o en línea con un prefiltro Sartorius Virosart® Max (5 cm²).

5 La Figura 37 es un gráfico del porcentaje de caída del flujo en función de la capacidad de carga de un filtro de virus Virosart® CPV funcionando con una presión de alimentación de 27-33 psi y un seguimiento de amortiguador de 12,5 ml. El material cargado en el filtro de virus Virosart® CPV se generó cargando un líquido que incluía 4 mg/ml u 8 mg/ml de eculizumab a 623 l/m² en un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm² (SHC) y un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm de 3,5 cm² (SHR), o un prefiltro Sartorius Virosart® Max (5 cm²).

10 La Figura 38 es un gráfico del flujo a lo largo del tiempo de un filtro de virus Virosart® CPV funcionando con una presión de alimentación de 27-33 psi y un seguimiento de amortiguador de 12,5 ml. El material cargado en el filtro de virus Virosart® CPV se generó cargando un líquido que incluía 4 mg/ml u 8 mg/ml de eculizumab a 623 l/m² en un prefiltro Millipore de 0,5/0,2 µm de 3,5 cm² (SHC) y un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm de 3,5 cm² (SHR), o un prefiltro Sartorius Virosart® Max (5 cm²).

15 La Figura 39 es un gráfico del porcentaje de caída de flujo en función de la capacidad de carga del filtro de virus Virosart® CPV funcionando a 200 l/m², con una presión de alimentación de 30 psi y un seguimiento de amortiguador de 12,5 ml. El material cargado en el filtro de virus Virosart® CPV se generó cargando un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm² (SHC) y un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm de 3,5 cm² (SHR), o un prefiltro Sartorius Virosart® Max (5 cm²). Durante la filtración con el filtro de virus Virosart® CPV, si se alcanzaba una caída del flujo del 80%, se detenía la filtración durante 60 minutos, y el eluato del prefiltro cargado en el filtro de virus Virosart® CPV se diluyó 4 veces en amortiguador.

20 La Figura 40 es un gráfico del flujo a lo largo del tiempo de un filtro de virus Virosart® CPV funcionando a 200 l/m², con una presión de alimentación de 30 psi y un seguimiento de amortiguador de 12,5 ml. El material cargado en el filtro de virus Virosart® CPV se generó cargando un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm² (SHC) y un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm de 3,5 cm² (SHR), o un prefiltro Sartorius Virosart® Max (5 cm²). Durante la filtración con el filtro de virus Virosart® CPV, si se alcanzaba una caída del flujo del 80%, se detenía la filtración durante 60 minutos, y el eluato del prefiltro cargado en el filtro de virus Virosart® CPV se diluyó 4 veces en amortiguador.

La Figura 41 es un esquema que muestra los diferentes procedimientos de purificación de proteínas de fusión recombinantes ensayados en el Ejemplo 10.

30 La Figura 42 es un gráfico del porcentaje de caída del flujo en función del rendimiento de un filtro de virus Virosart® CPV en cada uno de los diferentes procedimientos de purificación de proteínas de fusión recombinantes ensayados en el Ejemplo 10.

La Figura 43 es un gráfico que muestra el porcentaje de agregados de proteínas solubles y el nivel de partículas de proteínas insolubles en la proteína de fusión recombinante purificada al final de cada uno de los diferentes procedimientos de purificación ensayados en el Ejemplo 10.

35 La figura 44A es un gráfico que muestra la capacidad de cada uno de los tres filtros de profundidad ensayados diferentes para reducir el nivel de proteína de la célula hospedante en un fluido que incluye Alexion 1210 y proteína de la célula hospedante.

40 La Figura 44B es un gráfico que muestra el nivel de proteínas de la célula hospedante y agregados de proteínas solubles en Alexion 1210 purificado usando un procedimiento de purificación que no incluye el uso de un filtro de profundidad que tiene propiedades aniónicas e hidrófobas antes de la etapa de filtración viral (como se describe en el Ejemplo 10), y un procedimiento de purificación optimizado que incluye el uso de un amortiguador de lavado en la etapa de captura de proteína A y el uso de un filtro de profundidad que tiene propiedades aniónicas e hidrófobas antes de la etapa de filtración viral (como se describe en el Ejemplo 10).

#### 45 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Durante la fabricación de un anticuerpo recombinante, normalmente se hace pasar un fluido que incluye un anticuerpo recombinante a través de un filtro de virus para mejorar la seguridad del anticuerpo recombinante fabricado. Esta etapa de filtración viral puede ser una etapa limitante de la velocidad en la fabricación de un anticuerpo recombinante si el filtro de virus usado para llevar a cabo la filtración viral tiene un rendimiento bajo (por ejemplo, un rendimiento de menos de, por ejemplo, 500 g/m²). Aquí se proporcionan métodos de filtración viral que pueden dar como resultado un rendimiento de un filtro de virus mayor que 550 g/m² (por ejemplo, entre alrededor de 550 g/m² y alrededor de 15.000 g/m², entre alrededor de 550 g/m² y alrededor de 14.000 g/m², entre alrededor de 550 g/m² y alrededor de 13.000 g/m², entre alrededor de 550 g/m² y alrededor de 12.000 g/m², entre alrededor de 550 g/m² y alrededor de 11.000 g/m², entre alrededor de 550 g/m² y alrededor de 10.000 g/m², entre alrededor de 550 g/m² y alrededor de 9.000 g/m², entre alrededor de 550 g/m² y alrededor de 8.000 g/m², entre alrededor de 550 g/m² y alrededor de 7.000 g/m², entre alrededor de 550 g/m² y alrededor de 6.000 g/m², entre alrededor de 550 g/m² y alrededor de 5.000 g/m²,

[illegible]

[illegible]

alrededor de 5.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 11.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 5.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 10.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 5.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 9.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 5.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 8.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 5.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 7.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 5.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 6.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 6.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 15.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 6.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 14.000 g/m<sup>2</sup>, entre  
5 alrededor de 6.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 13.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 6.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 12.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 6.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 11.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 6.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 10.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 6.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 9.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 6.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 8.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 6.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 7.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 7.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 15.000 g/m<sup>2</sup>, entre  
10 alrededor de 7.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 14.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 7.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 13.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 7.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 12.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 7.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 11.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 7.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 10.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 7.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 9.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 7.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 8.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 8.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 15.000 g/m<sup>2</sup>, entre  
15 alrededor de 8.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 14.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 8.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 13.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 8.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 12.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 8.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 11.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 8.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 10.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 8.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 9.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 9.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 15.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 9.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 14.000 g/m<sup>2</sup>, entre  
20 alrededor de 9.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 13.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 9.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 12.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 9.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 11.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 9.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 10.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 10.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 15.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 10.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 14.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 10.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 13.000 g/m<sup>2</sup>, entre alrededor de 10.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 12.000 g/m<sup>2</sup>, o entre alrededor de 10.000 g/m<sup>2</sup> y alrededor de 11.000 g/m<sup>2</sup>) cuando un fluido que incluye un anticuerpo recombinante fluye a través del filtro de virus.

También se proporcionan aquí métodos para fabricar un anticuerpo recombinante o métodos para purificar un anticuerpo recombinante, que incluyen llevar a cabo una operación unitaria de filtración viral (por ejemplo, usando  
25 cualquiera de los métodos para llevar a cabo la filtración viral descrita aquí). Se describen aquí aspectos no limitativos de los métodos para llevar a cabo la filtración viral y los métodos para fabricar o purificar un anticuerpo recombinante.

#### Anticuerpos recombinantes

Los ejemplos de anticuerpos recombinantes incluyen IgG, IgE, IgD, IgA o IgM. Un anticuerpo recombinante puede ser cualquier subclase de IgG, tal como, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un anticuerpo quimérico (por ejemplo,  
30 un anticuerpo quimérico IgG2/4, tal como eculizumab). Un anticuerpo recombinante puede ser un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, tal como un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, o un fragmento scFv. El anticuerpo recombinante puede ser un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo triespecífico, o un anticuerpo dímero, trímero o multímero, o un diacuerpo, un AFFIBODY®, o un NANOBODY®. El anticuerpo recombinante puede ser una proteína manipulada mediante ingeniería que tenga cuatro dominios de unión al anticuerpo, tal como DVD-Ig y CODV-Ig.  
35 Véanse, por ejemplo, los documentos US2007/0071675 y WO2012/135345. Los ejemplos no limitativos de anticuerpos recombinantes son anticuerpos humanos o humanizados.

Los ejemplos de anticuerpos recombinantes pueden incluir uno o ambos de: un dominio variable de cadena pesada que incluye un total de entre una y seis (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis) histidinas en el conjunto de CDR1, CDR2, y CDR3; y un dominio variable de cadena ligera que incluye un total de entre una y seis (por ejemplo,  
40 una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis) histidinas en el conjunto de CDR1, CDR2 y CDR3. En algunos ejemplos, el anticuerpo recombinante incluye un dominio variable de cadena pesada que incluye un total de entre una y seis (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis) histidinas en el conjunto de CDR1, CDR2 y CDR3. En algunos ejemplos, el dominio variable de la cadena pesada incluye una CDR1 que incluye un resto de histidina y una CDR2 que incluye un resto de histidina.

En los métodos de la invención, el anticuerpo recombinante comprende una CDR1 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 1, una CDR2 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 2, y una CDR3 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 3. El anticuerpo recombinante puede comprender una región variable de cadena pesada que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 4. El anticuerpo recombinante puede comprender una cadena que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 5 (por ejemplo, cadena pesada de BNJ441). En el anticuerpo recombinante, la región variable de la  
50 cadena ligera incluye una CDR1 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 6, una CDR2 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 7, y una CDR3 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 8. El anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena ligera que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 9. El anticuerpo recombinante puede incluir una cadena ligera que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 10 (por ejemplo, cadena ligera de BNJ441).

Los ejemplos de anticuerpos recombinantes pueden incluir un dominio variable de cadena pesada que incluye una o más (por ejemplo, una, dos o tres) de una CDR1 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 11, una CDR2 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 12, y una CDR3 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 13. En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, el anticuerpo recombinante puede incluir una región variable de cadena pesada que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 14. En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, el anticuerpo recombinante puede incluir una cadena pesada que incluye  
60 una secuencia de SEQ ID NO: 15 (por ejemplo, cadena pesada de eculizumab). En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, la región variable de la cadena ligera incluye una o más (por ejemplo,

una, dos o tres) de una CDR1 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 17, y una CDR3 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 18. En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, el anticuerpo recombinante puede incluir una región variable de cadena ligera que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 19. En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, el anticuerpo recombinante puede incluir una cadena ligera que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 20 (por ejemplo, cadena ligera de eculizumab).

Los ejemplos de anticuerpos recombinantes pueden incluir un dominio variable de cadena pesada que incluye una o más (por ejemplo, una, dos o tres) de una CDR1 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 21, una CDR2 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 22, y una CDR3 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 23. En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, el anticuerpo recombinante puede incluir una región variable de cadena pesada que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 24. En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, el anticuerpo recombinante puede incluir una cadena pesada que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 25 (por ejemplo, cadena pesada de BNJ383). En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, la región variable de la cadena ligera incluye una o más (por ejemplo, una, dos o tres) de una CDR1 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 26, una CDR2 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 27, y una CDR3 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 28. En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, el anticuerpo recombinante puede incluir una región variable de cadena ligera que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 29. En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, el anticuerpo recombinante puede incluir una cadena ligera que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 30 (por ejemplo, cadena ligera de BNJ383).

Los ejemplos de anticuerpos recombinantes pueden incluir un dominio variable de cadena pesada que incluye una o más (por ejemplo, una, dos o tres) de una CDR1 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 31, una CDR2 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 32, y una CDR3 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 33. En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, el anticuerpo recombinante puede incluir una región variable de cadena pesada que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 34. En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, el anticuerpo recombinante puede incluir una cadena pesada que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 35 (por ejemplo, cadena pesada de samalizumab). En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, la región variable de cadena ligera incluye una o más (por ejemplo, una, dos o tres) de una CDR1 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 36, una CDR2 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 37, y una CDR3 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 38. En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, el anticuerpo recombinante puede incluir una región variable de cadena ligera que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 39. En algunos ejemplos de cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, el anticuerpo recombinante puede incluir una cadena ligera que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 40 (por ejemplo, cadena ligera de samalizumab).

Ejemplos adicionales de anticuerpos recombinantes incluyen panitumumab, omalizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, adecatumumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, alacizumab, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, amatuximab, anatomomab, anrukinzumab, apolizumab, arcitumomab, atinumab, tocilizumab, basilizimab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, besilesomab, bezlotoxumab, biciromab, canakinumab, certolizumab, cetuximab, cixutumumab, daclizumab, denosumab, densumab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, epratuzumab, ertumaxomab, etaracizumab, figitumumab, golimumab, ibritumomab tiuxetan, igovomab, imgatzumab, infliximab, inolimomab, inotuzumab, labetuzumab, lebrikizumab, moxetumomab, natalizumab, obinutuzumab, oregovomab, palivizumab, panitumumab, pertuzumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, tositumomab, tralokinumab, tucotuzumab, trastuzumab, veltuzumab, zalutumumab, y zalutumumab. En la técnica se conocen ejemplos adicionales de anticuerpos recombinantes.

#### Filtros de virus

Los filtros de virus pueden ser un filtro de flujo normal (NFF) o un filtro de filtración de flujo tangencial (TFF), tal como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. n.º 6.365.395. Tanto en el modo TFF como en el modo NFF, la filtración se realiza en condiciones para retener el virus, por ejemplo un virus que tiene un diámetro de 20 a 100 nanómetros (nm), en la superficie de la membrana mientras permite el paso del anticuerpo recombinante a través de la membrana.

Los filtros de virus ejemplares incluyen los formados a partir de celulosa regenerada (por ejemplo, celulosa regenerada con cupramonio), polietersulfona, poliarilsulfonas, polisulfona, poliimida, poliamida, difluoruro de polivinilideno (PVDF) o similares. Los ejemplos no limitativos de filtros de virus incluyen membranas VIREOLVE® y membranas RETROPORE™ disponibles de EMD Millipore, Billerica, MA. Estos se pueden suministrar en forma de cartucho (NFF), tales como filtros virales VIREOLVE® NFF, o como casetes (para TFF), tales como casetes PELLICON®, disponibles de EMD Millipore, Billerica, MA.

Los filtros de virus ejemplares adicionales que se pueden usar en cualquiera de los métodos descritos aquí incluyen Sartorius Virosart® CPV, que incluye una membrana de polietersulfona. Otros ejemplos de un filtro de virus que se puede usar en cualquiera de los métodos descritos aquí es el filtro Asahi BioEx y Millipore Viresolve® Pro, que incluye una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). En algunos ejemplos, un filtro de virus puede incluir una membrana de PVDF de fibra hueca. En algunos ejemplos, el filtro de virus es un filtro Asahi 20N, que incluye una

membrana de celulosa regenerada con cupramonio (por ejemplo, una membrana de celulosa regenerada con cupramonio de fibra hueca). En la técnica se conocen filtros de virus adicionales.

#### Prefiltros

5 Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos aquí incluyen hacer pasar un fluido que incluye un anticuerpo recombinante a través de un prefiltro, por ejemplo antes de que el fluido pase a través de un filtro de virus. Los ejemplos no limitativos de prefiltros incluyen un prefiltro Sartorius Virosart® Max, un prefiltro Millipore, un prefiltro Sartopore® 2, un prefiltro Sartobind STIC®, un prefiltro Sartobind® Q, un prefiltro Sartobind® HIC Phenyl, un prefiltro Sartobind® S, un prefiltro Millipore Viresolve® Pro Shield, un prefiltro CUNO delipid, y un prefiltro Millipore XOHC. En algunas realizaciones, un filtro de virus incluye una membrana de poliamida (por ejemplo, un prefiltro Sartorius Virosart® Max). Otros ejemplos de prefiltros incluyen una membrana basada en intercambio catiónico, una membrana basada en intercambio aniónico, y una membrana basada en cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). En la técnica se conocen ejemplos adicionales de prefiltros.

#### Agentes estabilizantes

15 Un agente estabilizante es un agente que reduce (por ejemplo, una reducción significativa o detectable) el radio hidrodinámico de un anticuerpo recombinante en un fluido, y/o minimiza el nivel de agregados de proteínas solubles y/o insolubles (por ejemplo, agregados de anticuerpos recombinantes solubles y/o insolubles, y/o agregados de proteínas de células hospedantes solubles y/o insolubles) en un fluido que incluye un anticuerpo recombinante. El radio hidrodinámico de un anticuerpo recombinante en un fluido se puede determinar usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo dispersión de luz dinámica. Los métodos para detectar el nivel o la cantidad de agregados de proteínas solubles e insolubles son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la cromatografía de exclusión por tamaños, la cromatografía en gel nativa (no desnaturalizante), la ultracentrifugación analítica (AUC), el fraccionamiento de flujo de campo (FFF), y la dispersión dinámica de luz se pueden usar para detectar la cantidad de agregados de proteínas solubles o insolubles presentes en un líquido.

25 Los ejemplos no limitativos de agentes estabilizantes incluyen arginina (por ejemplo, L-arginina o L-arginina HCl), alanina (por ejemplo, L-alanina), ácido aspártico (por ejemplo, ácido L-aspártico), ácido glutámico (por ejemplo, ácido L-glutámico), leucina (por ejemplo, L-leucina), lisina (por ejemplo, L-lisina), histidina (por ejemplo, L-histidina), glicina (por ejemplo, L-glicina), sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol, y Polisorbato 80. Cuando se usa Polisorbato 80 como agente estabilizante, puede estar presente en un fluido a una concentración de entre alrededor de 0,005% v/v y alrededor de 0,05% v/v, entre alrededor de 0,005% v/v y alrededor de 0,04%, entre alrededor de 0,005% v/v y alrededor de 0,03% v/v, entre alrededor de 0,005% v/v y alrededor de 0,02% v/v, entre alrededor de 0,005% v/v y alrededor de 0,01 % v/v, entre alrededor de 0,01% v/v y alrededor de 0,05% v/v, entre alrededor de 0,01% v/v y alrededor de 0,04% v/v, entre alrededor de 0,01% v/v y alrededor de 0,03% v/v, entre alrededor de 0,01% v/v y alrededor de 0,02% v/v, entre alrededor de 0,02% v/v y alrededor de 0,05% v/v, entre alrededor de 0,02 % v/v y alrededor de 0,04% v/v, entre alrededor de 0,02% v/v y alrededor de 0,03% v/v, entre alrededor de 0,03% v/v y alrededor de 0,05% v/v, entre alrededor de 0,03% v/v y alrededor de 0,04% v/v, o entre alrededor de 0,04% v/v y alrededor de 0,05% v/v). En la técnica se conocen ejemplos adicionales de agentes estabilizantes.

#### Métodos para llevar a cabo la filtración viral

Se proporcionan aquí métodos para llevar a cabo la filtración viral, que incluyen: (a) ajustar (por ejemplo, aumentar o disminuir) el pH de un fluido que incluye un anticuerpo recombinante (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí) entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,7 (por ejemplo, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,6, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,5, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,4, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,3, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,2, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,1, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,0, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 5,9, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 5,8, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 5,7, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 5,6, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 5,5, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 5,4, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 5,3, entre alrededor de 5,0 y alrededor de 5,2, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 6,7, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 6,6, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 6,5, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 6,4, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 6,3, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 6,2, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 6,1, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 6,0, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 5,9, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 5,8, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 5,7, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 5,6, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 5,5, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 5,4, entre alrededor de 5,1 y alrededor de 5,3, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 6,7, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 6,6, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 6,5, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 6,4, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 6,3, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 6,2, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 6,1, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 6,0, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 5,9, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 5,8, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 5,7, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 5,6, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 5,5, entre alrededor de 5,2 y alrededor de 5,4, entre alrededor de 5,3 y alrededor de 6,7, entre alrededor de 5,3 y alrededor de 6,6, entre alrededor de 5,3 y alrededor de 6,5, entre alrededor de 5,3 y alrededor de 6,4, entre alrededor de 5,3 y alrededor de 6,3, entre alrededor de 5,3 y alrededor de 6,2, entre alrededor de 5,3 y alrededor de 6,1, entre alrededor de 5,3 y alrededor de 6,0, entre alrededor de 5,3 y alrededor de 5,9, entre alrededor de 5,3 y alrededor de 5,8, entre alrededor de 5,3 y alrededor de 5,7, entre alrededor de 5,3 y

[illegible]

[illegible]

Los métodos pueden incluir además, inmediatamente antes de (b): hacer pasar el fluido a través de un prefiltro (por ejemplo, un prefiltro que incluye una membrana de poliamida, tal como un prefiltro Sartorius Virosart® Max). El fluido puede incluir además entre alrededor de 5 mM y alrededor de 300 mM de cloruro de sodio (por ejemplo, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 280 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 260 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 240 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 220 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 180 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 160 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 140 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 120 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 100 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 90 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 80 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 70 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 60 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 40 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 30 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 280 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 260 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 240 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 220 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 180 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 160 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 140 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 120 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 100 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 90 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 80 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 70 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 60 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 40 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 300 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 280 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 260 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 240 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 220 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 180 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 160 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 140 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 120 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 100 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 90 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 80 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 70 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 60 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 50 mM, entre alrededor de 20 mM y alrededor de 40 mM).

[illegible]

En estos métodos, antes de la etapa (a), el pH del fluido puede estar entre alrededor de 7,4 y alrededor de 7,8 (por ejemplo, entre alrededor de 7,4 y alrededor de 7,7, entre alrededor de 7,4 y alrededor de 7,6, entre alrededor de 7,5 y alrededor de 7,8, entre alrededor de 7,5 y alrededor de 7,7, entre alrededor de 7,6 y alrededor de 7,8, o alrededor de 7,6).

En cualquiera de los métodos para llevar a cabo la filtración viral descrita aquí, antes de (a), el fluido puede incluir entre alrededor de 0.1 mg/ml y alrededor de 25 mg/ml (por ejemplo, entre alrededor de 0.1 mg/ml y alrededor de 20

[illegible]

El fluido puede incluir entre alrededor de 50 mM y alrededor de 90 mM de cloruro de sodio (por ejemplo, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 80 mM, entre 50 mM y alrededor de 75 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 70 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 65 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 60 mM, entre alrededor de 50 mM y alrededor de 55 mM, entre alrededor de 55 mM y alrededor de 90 mM, entre alrededor de 55 mM y alrededor de 85 mM, entre alrededor de 55 mM y alrededor de 80 mM, entre alrededor de 55 mM y alrededor de 75 mM, entre alrededor de 55 mM y alrededor de 70 mM, entre alrededor de 55 mM y alrededor de 65 mM, entre alrededor de 55 mM y alrededor de 60 mM, entre alrededor de 60 mM y alrededor de 90 mM, entre alrededor de 60 mM y alrededor de 85 mM, entre alrededor de 60 mM y alrededor de 80 mM, entre alrededor de 60 mM y alrededor de 75

mM, entre alrededor de 60 mM y alrededor de 70 mM, entre alrededor de 60 mM y alrededor de 65 mM, entre alrededor de 65 mM y alrededor de 90 mM, entre alrededor de 65 mM y alrededor de 85 mM, entre alrededor de 65 mM y alrededor de 80 mM, entre alrededor de 65 mM y alrededor de 75 mM, entre alrededor de 65 mM y alrededor de 70 mM, entre alrededor de 70 mM y alrededor de 90 mM, entre alrededor de 70 mM y alrededor de 85 mM, entre alrededor de 70 mM y alrededor de 80 mM, entre alrededor de 70 mM y alrededor de 75 mM, entre alrededor de 75 mM y alrededor de 90 mM, entre alrededor de 75 mM y alrededor de 85 mM, entre alrededor de 75 mM y alrededor de 80 mM, entre alrededor de 80 mM y alrededor de 90 mM, entre alrededor de 80 mM y alrededor de 85 mM, o entre alrededor de 85 mM y alrededor de 90 mM de cloruro de sodio).

En los métodos de la invención, el anticuerpo recombinante incluye una CDR1 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 1, una CDR2 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 2, y una CDR3 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 3, en su región variable de cadena pesada. Por ejemplo, la región variable de cadena pesada puede incluir una secuencia de SEQ ID NO: 4. La cadena pesada puede incluir una secuencia de SEQ ID NO: 5 (cadena pesada de BNJ441). En los métodos de la invención, la región variable de cadena ligera incluye una CDR1 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 6, una CDR2 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 7, y una CDR3 que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 8. Por ejemplo, el dominio variable de cadena ligera puede incluir una secuencia de SEQ ID NO: 9. La cadena ligera puede incluir una secuencia de SEQ ID NO: 10 (cadena ligera de BNJ441).

#### Métodos de purificación o fabricación de un anticuerpo recombinante

Se proporcionan aquí métodos para purificar un anticuerpo recombinante, y métodos para fabricar un anticuerpo recombinante. Los métodos pueden incluir, por ejemplo, (a) capturar un anticuerpo recombinante de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante, por ejemplo un medio de cultivo líquido clarificado o un fluido amortiguado que incluye el anticuerpo recombinante; (b) después de la captura, llevar a cabo una o más operaciones unitarias en el anticuerpo recombinante; y tras las etapas (a) y (b), llevar a cabo la filtración viral en el anticuerpo recombinante para proporcionar un filtrado que incluye el anticuerpo recombinante purificado y, por ejemplo, opcionalmente está sustancialmente libre de agregados de proteínas solubles (por ejemplo, usando cualquiera de los métodos para llevar a cabo la filtración viral descrita aquí); y opcionalmente, además, (d) llevar a cabo una o más operaciones unitarias en el anticuerpo recombinante purificado. Se puede llevar a cabo al menos una unidad de operación (tal como dos, tres o cuatro) antes de la etapa de captura (por ejemplo, seleccionada del grupo de clarificación de un medio de cultivo, ultrafiltración/diafiltración para concentrar el anticuerpo recombinante en un fluido, inactivación viral, y ajuste (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) de uno o ambos del pH y la concentración iónica de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante). La etapa (b) puede incluir llevar a cabo una o más (tal como dos, tres o cuatro) operaciones unitarias en el anticuerpo recombinante, por ejemplo seleccionadas del grupo de ultrafiltración/diafiltración para concentrar el anticuerpo recombinante en un fluido, purificación del anticuerpo recombinante, pulido del anticuerpo recombinante, inactivación de los virus, y ajuste (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) de uno o ambos del pH y la concentración iónica de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante. La etapa (b) puede incluir, inmediatamente antes de llevar a cabo la filtración viral, una etapa de realizar la operación unitaria de prefiltración haciendo pasar un fluido que incluye el anticuerpo recombinante a través de un prefiltro. La etapa (b) puede incluir la realización de las siguientes operaciones unitarias de: purificación del anticuerpo recombinante, inactivación de los virus, ultrafiltración/diafiltración para concentrar el anticuerpo recombinante en un fluido, filtración de profundidad (por ejemplo, usando cualquiera de los filtros de profundidad ejemplares descritos aquí), ajuste (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) del pH y de la concentración iónica de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante, y prefiltración (por ejemplo, usando cualquiera de los prefiltros ejemplares descritos aquí).

Se pueden llevar a cabo una o más (dos, tres o cuatro) operaciones unitarias después de la etapa de llevar a cabo la filtración viral (por ejemplo, una o más operaciones unitarias seleccionadas del grupo de purificación del anticuerpo recombinante, pulido del anticuerpo recombinante, ajuste (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) uno o ambos del pH y la concentración iónica de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante purificado, o haciendo pasar el fluido a través de un filtro de virus adicional). Se puede llevar a cabo una etapa de formular el anticuerpo recombinante purificado después de llevar a cabo la filtración viral.

Los métodos proporcionados aquí pueden dar como resultado un anticuerpo recombinante purificado que está, por ejemplo, al menos o alrededor de 95%, 96%, 97%, 98%, 98,2%, 98,4%, 98,6%, 98,8%, 99,0%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% o 99,9% libre de agregados de proteínas solubles o no incluye agregados de proteínas solubles detectables. Los métodos proporcionados aquí también pueden proporcionar, por ejemplo, una reducción, tal como hasta una reducción del 5%, hasta una reducción del 10%, hasta una reducción del 15%, hasta una reducción del 20%, hasta una reducción del 25%, hasta una reducción del 30%, hasta una reducción del 35%, hasta una reducción del 40%, hasta una reducción del 45%, hasta una reducción del 50%, hasta una reducción del 55%, hasta una reducción del 60%, hasta una reducción del 65%, hasta una reducción del 70%, hasta una reducción del 75%, hasta una reducción del 80%, hasta una reducción del 85%, hasta una reducción del 90%, hasta una reducción del 95%, o hasta una reducción del 99% en la proteína de la célula hospedante presente en un anticuerpo recombinante purificado (por ejemplo, en comparación con un anticuerpo recombinante purificado producido por un método que no incluye una etapa de filtración viral llevada a cabo usando cualquiera de los métodos descritos aquí (y opcionalmente tampoco incluye una etapa de prefiltración previa a la etapa de filtración viral), después de una etapa de captura de la proteína recombinante (y opcionalmente además, tras una o más operaciones unitarias adicionales)). Los métodos para determinar el nivel de proteína de la célula hospedante son bien conocidos en la técnica. Por

ejemplo, los kits para detectar el nivel de proteína de la célula hospedante están disponibles comercialmente en Cygnus Technologies (Southport, NC), ArrayBridge (St. Louis, MO), Cisbio (Bedford, MA) y Lonza (Basilea, Suiza).

En los métodos descritos aquí, el filtrado producido por la filtración viral en la etapa (c) puede incluir un nivel reducido (por ejemplo, hasta una reducción del 5%, hasta una reducción del 10%, hasta una reducción del 15%, hasta una reducción del 20%, hasta una reducción del 30%, hasta una reducción del 35%, hasta una reducción del 40%, hasta una reducción del 45%, hasta una reducción del 50%, hasta una reducción del 55%, hasta una reducción del 60%, hasta una reducción del 60%, hasta una reducción del 70%, hasta una reducción del 75%, hasta una reducción del 80%, hasta una reducción del 85%, hasta una reducción del 90%, hasta una reducción del 95%, o hasta una reducción del 99%) en el nivel de agregados de proteínas solubles (por ejemplo, en comparación con un nivel de agregados de proteínas solubles en un anticuerpo recombinante purificado producido por un método que no incluye una etapa de filtración viral llevada a cabo usando cualquiera de los métodos descrito aquí (y opcionalmente tampoco incluye una etapa de prefiltración antes de la etapa de filtración viral), después de una etapa de captura de la proteína recombinante (y opcionalmente además, tras una o más operaciones unitarias adicionales)).

Los métodos proporcionados aquí también pueden dar como resultado un anticuerpo recombinante purificado que tiene un nivel reducido de inmunogenicidad cuando se administra a un sujeto (tal como un sujeto humano) (por ejemplo, en comparación con la inmunogenicidad de un anticuerpo recombinante purificado producido por un método que no incluye una etapa de filtración viral llevada a cabo usando cualquiera de los métodos descritos aquí (y opcionalmente tampoco incluye una etapa de prefiltración antes de la etapa de filtración viral), después de una etapa de captura de la proteína recombinante (y opcionalmente además, tras una o más operaciones unitarias adicionales)).

Los métodos proporcionados aquí pueden proporcionar además un riesgo reducido de contaminación o ensuciamiento del filtro de virus en un método de purificación de una proteína recombinante y un método de fabricación de un producto de proteína recombinante o en un sistema usado para llevar a cabo el mismo (por ejemplo, en comparación con un método que no incluye una etapa de filtración viral llevada a cabo usando cualquiera de los métodos descritos aquí (y opcionalmente tampoco incluye una etapa de prefiltración antes de la etapa de filtración viral), después de una etapa de captura de la proteína recombinante (y opcionalmente además, tras una o más operaciones unitarias adicionales), o un sistema usado para llevar a cabo el mismo).

#### Células y cultivo de células

Las células que incluyen un ácido nucleico que codifica un anticuerpo recombinante pueden usarse para producir el anticuerpo recombinante (tal como un anticuerpo recombinante segregado). En algunos ejemplos, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo recombinante se integra de forma estable en el genoma de la célula. Las células usadas para producir el anticuerpo recombinante pueden ser bacterias (por ejemplo, bacterias gramnegativas), levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, o *Arxula adeninivorans*), o células de mamífero.

La célula de mamífero usada para producir el anticuerpo recombinante puede ser una célula que crece en suspensión o una célula adherente. Los ejemplos no limitativos de células de mamífero que se pueden cultivar para producir un anticuerpo recombinante (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí, tales como eculizumab, samalizumab, BNJ441 y BNJ383) incluyen: células de ovario de hámster chino (CHO) (tales como células CHO DG44 o células CHO-K1s), Sp2.0, células de mieloma (tales como células NS/0), células B, células de hibridoma, células T, células de riñón embrionario humano (HEK) (tales como HEK 293E y HEK 293F), células epiteliales de riñón de mono verde africano (Vero), y células epiteliales de riñón de Madin-Darby Canine (Cocker Spaniel) (MDCK). En algunos ejemplos en los que se usa una célula adherente para producir un anticuerpo recombinante, la célula se cultiva en presencia de una pluralidad de microportadores (tales como microportadores que incluyen uno o más poros). En la técnica se conocen células de mamífero adicionales que pueden cultivarse para producir un anticuerpo recombinante (tal como un anticuerpo recombinante segregado). En algunos casos, la célula de mamífero se cultiva en un biorreactor. La célula de mamífero usada para inocular un biorreactor puede derivar de un lote celular congelado o de un cultivo de tren de semillas.

Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo recombinante puede introducirse en una célula de mamífero usando una amplia variedad de métodos conocidos en biología molecular y genética molecular. Los ejemplos no limitativos incluyen transfección (por ejemplo, lipofección), transducción (por ejemplo, infección por lentivirus, adenovirus, o retrovirus), y electroporación. En algunos casos, el ácido nucleico no se integra de forma estable en un cromosoma de la célula de mamífero (transfección transitoria), mientras que en otros se integra de forma estable en un cromosoma de la célula de mamífero. Alternativamente o además, el ácido nucleico puede estar presente en un plásmido y/o en un cromosoma artificial de mamífero (tal como un cromosoma artificial humano). Alternativamente o además, el ácido nucleico se puede introducir en la célula usando un vector viral (tal como un vector de lentivirus, retrovirus, o adenovirus). El ácido nucleico puede unirse operativamente a una secuencia promotora (tal como un promotor fuerte, tal como un promotor de  $\beta$ -actina y un promotor de CMV, o un promotor inducible). El ácido nucleico puede unirse operativamente a un promotor heterólogo. Un vector que incluye el ácido nucleico puede incluir también, si se desea, un marcador seleccionable (tal como un gen que confiere resistencia a higromicina, puromicina o neomicina a la célula de mamífero).

Como se señala aquí, el anticuerpo recombinante puede ser un anticuerpo segregado que es liberado por la célula de mamífero al medio extracelular. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo recombinante soluble puede incluir una secuencia que codifica un péptido señal de secreción en el extremo N-terminal del anticuerpo recombinante, que es escindido por una enzima presente en la célula de mamífero y posteriormente es liberado en el medio extracelular (tal como el primer y/o segundo medio de cultivo líquido en un cultivo celular de perfusión, o el primer medio de cultivo líquido y/o el medio de cultivo de alimentación líquido en un cultivo alimentado por lotes).

Cualquiera de los métodos descritos aquí puede incluir además el cultivo de una célula de mamífero, que incluye un ácido nucleico que codifica un anticuerpo recombinante, en condiciones suficientes para producir el anticuerpo recombinante (tal como un anticuerpo recombinante segregado).

#### Cultivo alimentado por lotes

La etapa de cultivo en los métodos descritos aquí puede incluir el cultivo alimentado por lotes. Como se sabe en la técnica, el cultivo alimentado por lotes incluye la adición incremental (periódica) o continua de un medio de cultivo de alimentación a un cultivo celular inicial, que incluye un primer medio de cultivo líquido, sin una eliminación sustancial o significativa del primer medio de cultivo líquido del cultivo celular. El cultivo celular en el cultivo alimentado por lotes se puede desechar en un biorreactor (por ejemplo, un biorreactor de producción, tal como un biorreactor de producción de 10.000 l). En algunos casos, el medio de cultivo de alimentación es el mismo que el primer medio de cultivo líquido. El medio de cultivo de alimentación puede estar en forma líquida o en polvo seco. En otros casos, el medio de cultivo de alimentación es una forma concentrada del primer medio de cultivo líquido, y/o se añade como un polvo seco. Tanto un primer medio de cultivo de alimentación líquido como un segundo medio de cultivo de alimentación líquido diferente pueden añadirse (por ejemplo, añadirse continuamente) al primer medio de cultivo líquido. En algunos ejemplos, la adición del primer medio de cultivo de alimentación líquido y la adición del segundo medio de cultivo de alimentación líquido al cultivo se inician aproximadamente a la vez. En algunos ejemplos, el volumen total del primer medio de cultivo de alimentación líquido y del segundo medio de cultivo de alimentación líquido añadidos al cultivo durante todo el período de cultivo son aproximadamente iguales.

Cuando el medio de cultivo de alimentación se añade continuamente, la velocidad de adición del medio de cultivo de alimentación puede mantenerse constante o puede aumentarse (por ejemplo, aumentarse constantemente) durante el período de cultivo. Una adición continua de medio de cultivo de alimentación puede comenzar en un momento específico durante el período de cultivo (por ejemplo, cuando las células de mamífero alcanzan una densidad de células viables diana, por ejemplo una densidad de células viables de alrededor de  $1 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,1 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,2 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,3 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,4 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,5 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,6 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,7 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,8 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,9 \times 10^6$  células/ml, o alrededor de  $2,0 \times 10^6$  células/ml). La adición continua de medio de cultivo de alimentación se puede iniciar el día 2, el día 3, el día 4 o el día 5 del período de cultivo.

En algunos ejemplos, una adición incremental (periódica) de medio de cultivo de alimentación puede comenzar cuando las células de mamífero alcanzan una densidad celular diana (por ejemplo, alrededor de  $1 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,1 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,2 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,3 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,4 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,5 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,6 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,7 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,8 \times 10^6$  células/ml, alrededor de  $1,9 \times 10^6$ , o alrededor de  $2,0 \times 10^6$  células/ml). La adición incremental de medios de cultivo de alimentación puede ocurrir a intervalos regulares (por ejemplo, todos los días, cada dos días, o cada tercer día), o puede ocurrir cuando las células alcanzan densidades de células diana específicas (por ejemplo, densidades de células diana que aumentan durante el período de cultivo). En algunos ejemplos, la cantidad de medio de cultivo de alimentación añadida puede aumentar progresivamente entre la primera adición incremental de medio de cultivo de alimentación y las adiciones posteriores de medio de cultivo de alimentación. El volumen de un medio de cultivo de alimentación de cultivo líquido añadido al cultivo celular inicial durante cualquier período de 24 horas en el período de cultivo puede ser una fracción del volumen inicial del biorreactor que contiene el cultivo, o una fracción del volumen del cultivo inicial.

Por ejemplo, la adición del medio de cultivo de alimentación líquido (continua o periódicamente) puede ocurrir en un punto de tiempo entre 6 horas y 7 días, entre alrededor de 6 horas y alrededor de 6 días, entre alrededor de 6 horas y alrededor de 5 días, entre alrededor de 6 horas y alrededor de 4 días, entre alrededor de 6 horas y alrededor de 3 días, entre alrededor de 6 horas y alrededor de 2 días, entre alrededor de 6 horas y alrededor de 1 día, entre alrededor de 12 horas y alrededor de 7 días, entre alrededor de 12 horas y alrededor de 6 días, entre alrededor de 12 horas y alrededor de 5 días, entre alrededor de 12 horas y alrededor de 4 días, entre alrededor de 12 horas y alrededor de 3 días, entre alrededor de 12 horas y alrededor de 2 días, entre alrededor de 1 día y alrededor de 7 días, entre alrededor de 1 día y alrededor de 6 días, entre alrededor de 1 día y alrededor de 5 días, entre alrededor de 1 día y alrededor de 4 días, entre alrededor de 1 día y alrededor de 3 días, entre alrededor de 1 día y alrededor de 2 días, entre alrededor de 2 días y alrededor de 7 días, entre alrededor de 2 días y alrededor de 6 días, entre alrededor de 2 días y alrededor de 5 días, entre alrededor de 2 días y alrededor de 4 días, entre alrededor de 2 días y alrededor de 3 días, entre alrededor de 3 días y alrededor de 7 días, entre alrededor de 3 días y alrededor de 6 días, entre alrededor de 3 días y alrededor de 5 días, entre alrededor de 3 días y alrededor de 4 días, entre alrededor de 4 días y alrededor de 7 días, entre alrededor de 4 días y alrededor de 6 días, entre alrededor de 4 días y alrededor de 5 días, entre alrededor de 5 días y alrededor de 7 días, o entre alrededor de 5 días y alrededor de 6 días, después del inicio del período de cultivo.

El volumen de un medio de cultivo de alimentación líquido añadido (continua o periódicamente) al cultivo celular inicial durante cualquier período de 24 horas puede estar entre 0,01X y alrededor de 0,3X de la capacidad del biorreactor. El volumen de un medio de cultivo de alimentación líquido añadido (continua o periódicamente) al cultivo celular inicial durante cualquier período de 24 horas durante el período de cultivo puede estar entre 0,02X y alrededor de 1,0X del volumen del cultivo celular inicial. La cantidad total de medio de cultivo de alimentación añadido (continua o periódicamente) durante todo el período de cultivo puede estar entre alrededor del 1% y alrededor del 40% del volumen del cultivo inicial.

En algunos ejemplos, se añaden dos medios de cultivo de alimentación diferentes (de forma continua o incremental) durante el cultivo alimentado por lotes. La cantidad o el volumen del primer medio de cultivo de alimentación y del segundo medio de cultivo de alimentación añadidos pueden ser sustancialmente iguales, o pueden diferir. El primer medio de cultivo de alimentación puede estar en forma de un líquido y el segundo medio de cultivo de alimentación puede estar en forma de un sólido, o viceversa. El primer medio de cultivo de alimentación y el segundo medio de cultivo de alimentación pueden ser medios de cultivo de alimentación líquidos.

#### Cultivo de perfusión

La etapa de cultivo en los métodos descritos aquí puede ser el cultivo por perfusión. Como se sabe en la técnica, el cultivo por perfusión incluye extraer de un biorreactor (por ejemplo, un biorreactor de producción) un primer volumen de un primer medio de cultivo líquido, y añadir al biorreactor de producción un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, en el que el primer volumen y el segundo volumen son típicamente (pero no necesariamente) aproximadamente iguales. Las células de mamífero se retienen en el biorreactor mediante algún dispositivo de retención celular o mediante técnicas conocidas en la técnica, tal como sedimentación celular. La eliminación y la adición de medios de cultivo en el cultivo de perfusión se pueden llevar a cabo de forma simultánea o secuencial, o en alguna combinación de las dos. Además, la eliminación y la adición se pueden llevar a cabo de forma continua, tal como a una velocidad que elimina y reemplaza un volumen de entre 0,1% y 800%, entre 1% y 700%, entre 1% y 600%, entre 1% y 500%, entre 1% y 400%, entre 1% y 350%, entre 1% y 300%, entre 1% y 250%, entre 1% y 100%, entre 100% y 200%, entre 5% y 150%, entre 10% y 50%, entre 15% y 40%, entre 8% y 80%, o entre 4% y 30% de la capacidad del biorreactor durante un incremento de tiempo (por ejemplo, durante un incremento de tiempo de 24 horas).

El primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido pueden mantenerse, en algunos casos, aproximadamente iguales durante cada período de 24 horas. Como es conocido en la técnica, la velocidad a la que se elimina el primer volumen del primer medio de cultivo líquido (volumen/unidad de tiempo) y la velocidad a la que se añade el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido (volumen/unidad de tiempo) pueden variar, y dependen de las condiciones del sistema de cultivo celular en particular. La velocidad a la que se elimina el primer volumen del primer medio de cultivo líquido (volumen/unidad de tiempo) y la velocidad a la que se añade el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido (volumen/unidad de tiempo) pueden ser aproximadamente iguales, o pueden ser diferentes.

Alternativamente, el volumen eliminado y añadido puede cambiar aumentando gradualmente durante cada período de 24 horas. Por ejemplo, el volumen del primer medio de cultivo líquido eliminado y el volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido dentro de cada período de 24 horas se pueden aumentar durante el período de cultivo. El volumen se puede aumentar hasta un volumen que está entre el 0,5% y alrededor del 20% de la capacidad del biorreactor durante un período de 24 horas. El volumen se puede aumentar durante el período de cultivo hasta un volumen que es alrededor del 25% y alrededor del 150% de la capacidad del biorreactor o el volumen del primer medio de cultivo líquido durante un período de 24 horas.

En algunos ejemplos de los métodos descritos aquí, después de las primeras 48 a 96 horas del período de cultivo, en cada período de 24 horas, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido eliminado y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido es alrededor del 10% y alrededor del 95%, alrededor del 10% y alrededor del 20%, alrededor del 20% y alrededor del 30%, alrededor del 30% y alrededor del 40%, alrededor del 40% y alrededor del 50%, alrededor del 50% y alrededor del 60%, alrededor del 60% y alrededor del 70%, alrededor del 70% y alrededor del 80%, alrededor del 80% y alrededor del 90%, alrededor del 85% y alrededor del 95%, alrededor del 60% y alrededor del 80%, o alrededor del 70% del volumen del primer medio de cultivo líquido.

Los expertos apreciarán que el primer medio de cultivo líquido y el segundo medio de cultivo líquido pueden ser el mismo tipo de medio. En otros casos, el primer medio de cultivo líquido y el segundo medio de cultivo líquido pueden ser diferentes. El segundo medio de cultivo líquido puede estar más concentrado con respecto a uno o más componentes de los medios. El primer medio de cultivo líquido puede incluir BSA procesada, el segundo medio de cultivo líquido incluye BSA procesada, o tanto el primer como el segundo medio de cultivo líquido incluyen BSA procesada.

El primer volumen del primer medio de cultivo líquido puede eliminarse usando cualquier método, por ejemplo usando un sistema automatizado. Por ejemplo, puede usarse filtración de flujo tangencial alterno. Alternativamente, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido puede eliminarse por filtración o flujo por gravedad del primer volumen del primer medio de cultivo líquido a través de una membrana estéril con un corte de peso molecular que excluye la célula

de mamífero. Alternativamente, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido puede eliminarse deteniendo o disminuyendo significativamente la velocidad de agitación durante un período de al menos 1 minuto, al menos 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, o 1 hora, y eliminando o aspirando el primer volumen del primer medio de cultivo líquido de la parte superior del biorreactor de producción.

El segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido se puede añadir al primer medio de cultivo líquido mediante una bomba. El segundo medio de cultivo líquido se puede añadir al primer medio líquido de forma manual, tal como pipeteando o inyectando el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido directamente sobre el primer medio de cultivo líquido, o de forma automática.

#### Medio de cultivo líquido y clarificación

Un fluido que incluye un anticuerpo recombinante, por ejemplo un medio de cultivo líquido que incluye un anticuerpo recombinante y que está sustancialmente libre de células, puede derivar de cualquier fuente. Por ejemplo, un medio de cultivo líquido se puede obtener a partir de un cultivo de células recombinantes (tal como un cultivo de células recombinantes de bacterias, levaduras o mamíferos). El medio de cultivo líquido se puede obtener a partir de un cultivo de células de mamíferos alimentado por lotes (tal como un biorreactor alimentado por lotes que contiene un cultivo de células de mamíferos que segregan el anticuerpo recombinante) o un cultivo de células de mamíferos por perfusión (tal como un biorreactor de perfusión que contiene un cultivo de células de mamífero que segregan el anticuerpo recombinante). El medio de cultivo líquido puede ser un medio de cultivo líquido clarificado procedente de un cultivo de células bacterianas, de levadura o de mamífero que segregan el anticuerpo recombinante.

El medio de cultivo líquido obtenido de un cultivo de células recombinantes se puede clarificar para obtener un medio de cultivo líquido que esté sustancialmente libre de células y que incluya un anticuerpo recombinante (también llamado medio de cultivo clarificado o medio de cultivo líquido clarificado). Los métodos para clarificar un medio de cultivo líquido con el fin de eliminar las células son conocidos en la técnica (tal como mediante el uso de filtración de 0,2  $\mu\text{m}$  y filtración usando un sistema de flujo tangencial alterno (ATF™) o filtración de flujo tangencial (TFF)). Las células recombinantes se pueden eliminar del medio de cultivo líquido usando centrifugación, y eliminando el sobrenadante o permitiendo que las células sedimenten en el fondo gravitatorio de un recipiente (tal como un biorreactor) y eliminando el medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de células. El medio de cultivo líquido se puede obtener a partir de un cultivo de células recombinantes (tales como células recombinantes de bacterias, levaduras o mamíferos) que producen cualquiera de los anticuerpos recombinantes descritos aquí.

El medio de cultivo líquido que incluye un anticuerpo recombinante, o el medio de cultivo líquido usado para cultivar una célula de mamífero que incluye un ácido nucleico que codifica un anticuerpo recombinante (tal como el primer y el segundo medio de cultivo líquido en el cultivo por perfusión, o el primer medio de cultivo líquido y el medio de cultivo de alimentación líquido en el cultivo alimentado por lotes), puede ser cualquiera de los tipos de medio de cultivo líquido descritos aquí o conocidos en la técnica. Por ejemplo, cualquiera de los medios de cultivo líquidos descritos aquí puede seleccionarse del grupo de: medio de cultivo líquido sin componentes derivados de animales, medio de cultivo líquido sin suero, medio de cultivo líquido que contiene suero, medio de cultivo líquido definido químicamente, y medio de cultivo líquido libre de proteínas. En cualquiera de los procedimientos descritos aquí, un medio de cultivo líquido obtenido de un cultivo se puede diluir mediante la adición de un segundo líquido (tal como una disolución amortiguada) antes o después de que se aclare y/o antes de que se capture el anticuerpo recombinante.

El medio de cultivo líquido que incluye un anticuerpo recombinante y está sustancialmente libre de células se puede almacenar (por ejemplo, a una temperatura por debajo de alrededor de 15°C, por debajo de alrededor de 10°C, por debajo de alrededor de 4°C, por debajo de alrededor de 0°C, por debajo de alrededor de -20°C, por debajo de alrededor de -50°C, por debajo de alrededor de -70°C, o por debajo de alrededor de -80°C) durante al menos o alrededor de 1 día, al menos o alrededor de 2 días, al menos o alrededor de 5 días, al menos o alrededor de 10 días, al menos o alrededor de 15 días, al menos o alrededor de 20 días, o al menos o alrededor de 30 días) antes de capturar el anticuerpo recombinante del medio de cultivo líquido. Alternativamente, en algunos ejemplos, el anticuerpo recombinante se captura del medio de cultivo líquido directamente de un biorreactor después de una etapa de clarificación.

#### Captura del anticuerpo recombinante

Los métodos proporcionados aquí pueden incluir una etapa de capturar un anticuerpo recombinante de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante (tal como un medio de cultivo líquido clarificado que incluye el anticuerpo recombinante segregado, o un medio de cultivo líquido clarificado que incluye el anticuerpo recombinante que se ha diluido con una disolución amortiguada).

Como puede apreciarse en la técnica, mediante la realización de la etapa de captura, el anticuerpo recombinante puede purificarse o aislarse parcialmente (por ejemplo, al menos o alrededor del 5%, por ejemplo al menos o alrededor del 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o al menos o alrededor del 95% puro en peso), concentrarse, y estabilizarse a partir de uno o más componentes presentes en un medio de cultivo líquido clarificado que incluye el anticuerpo recombinante (tales como proteínas del medio de cultivo o uno o

más componentes (tales como ADN, ARN, u otras proteínas) presentes o segregados por un célula de mamífero). Normalmente, la captura se realiza usando una resina que se une a un anticuerpo recombinante (tal como mediante el uso de cromatografía de afinidad). Se describen aquí ejemplos no limitativos de métodos para capturar un anticuerpo recombinante a partir de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante (tal como un medio de cultivo líquido clarificado), y otros son conocidos en la técnica. Un anticuerpo recombinante se puede capturar de un fluido usando al menos una columna de cromatografía (tal como cualquiera de las columnas de cromatografía y/o mecanismos de captura descritos aquí, tal como una resina de cromatografía de afinidad, una resina de cromatografía de intercambio aniónico, una resina de cromatografía de intercambio catiónico, una resina de cromatografía de modo mixto, una resina de cromatografía de tamices moleculares, o una resina de cromatografía de interacción hidrófoba). La etapa de captura se puede llevar a cabo usando una resina de cromatografía que utiliza un mecanismo de captura de unión a proteína A, un mecanismo de captura de unión a anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un mecanismo de captura de unión a sustrato, y un mecanismo de captura de unión a antígeno. El sistema de captura puede ser un mecanismo de captura de unión a proteína A o un mecanismo de captura de unión a antígeno (en el que el antígeno de captura es reconocido específicamente por el anticuerpo recombinante). Si la enzima recombinante incluye una etiqueta, el sistema de captura puede ser una proteína, un quelato metálico, o un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) que se une específicamente a la etiqueta presente en el anticuerpo recombinante. Se describen aquí ejemplos no limitativos de resinas que se pueden usar para capturar un anticuerpo recombinante, y se conocen resinas adicionales en la técnica. Ejemplos no limitativos de resina que utilizan un mecanismo de captura de unión a proteína A es resina MABSELECT<sup>™</sup> SURE<sup>™</sup> y Protein A Sepharose<sup>™</sup> CL-4B (GE Healthcare).

Los tamaños y formas ejemplares no limitativos de la o las columnas de cromatografía que pueden usarse para capturar el anticuerpo recombinante son bien conocidos en la técnica. El medio de cultivo líquido alimentado (cargado) puede incluir, por ejemplo, entre alrededor de 0,05 mg/ml y alrededor de 100 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 90 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 80 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 70 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 60 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 50 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 40 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 30 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 20 mg/ml, entre alrededor de 0,5 mg/ml y alrededor de 20 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 15 mg/ml, entre alrededor de 0,5 mg/ml y alrededor de 15 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml, o entre alrededor de 0,5 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml de anticuerpo recombinante.

Como puede apreciarse en la técnica, para capturar el anticuerpo recombinante usando la o las columnas de cromatografía, se deben llevar a cabo las etapas cromatográficas secuenciales de cargar, lavar, eluir y regenerar la o las columnas de cromatografía o la o las membranas de cromatografía.

Después de cargar el anticuerpo recombinante en al menos una columna cromatográfica que incluye una resina que es capaz de capturar el anticuerpo recombinante, al menos una columna cromatográfica o membrana cromatográfica se lava con al menos un amortiguador de lavado. Como se puede apreciar en la técnica, el al menos un (tal como dos, tres o cuatro) amortiguador de lavado está destinado a eluir todas las proteínas que no son el anticuerpo recombinante de la al menos una columna de cromatografía, sin perturbar la interacción del anticuerpo recombinante con la resina.

Después del lavado, el anticuerpo recombinante se eluye de la al menos una columna cromatográfica o membrana cromatográfica haciendo pasar un amortiguador de elución a través de la al menos una columna cromatográfica o membrana cromatográfica. Los ejemplos no limitativos de amortiguadores de elución que se pueden usar en estos métodos dependerán del mecanismo de captura y/o del anticuerpo recombinante. Por ejemplo, un amortiguador de elución puede incluir una concentración diferente de sal (por ejemplo, una concentración de sal aumentada), un pH diferente (por ejemplo, una concentración de sal aumentada o disminuida), o una molécula que competirá con el anticuerpo recombinante para unirse a la resina que es capaz de llevar a cabo la operación unitaria de captura. Los ejemplos de dichos amortiguadores de elución para cada mecanismo de captura ilustrativo descrito aquí son bien conocidos en la técnica.

Después de la elución del anticuerpo recombinante de la al menos una columna cromatográfica que incluye una resina que es capaz de capturar el anticuerpo recombinante, y antes de que se pueda cargar el siguiente volumen de fluido que incluye el anticuerpo recombinante en al menos una columna cromatográfica, la al menos una columna de cromatografía o membrana cromatográfica debe equilibrarse usando un amortiguador de regeneración.

#### Filtración de profundidad

Los métodos pueden incluir una operación unitaria de filtración de profundidad. La filtración de profundidad incluye hacer pasar el anticuerpo recombinante a través de un filtro de profundidad para proporcionar un filtrado que incluye el anticuerpo recombinante purificado y que, por ejemplo, está sustancialmente libre de agregados de proteínas solubles. Cualquiera de los filtros de profundidad ejemplares o métodos para la filtración de profundidad descritos aquí se puede usar para hacer pasar un anticuerpo recombinante a través de un filtro de profundidad.

El anticuerpo recombinante se puede hacer pasar a través del filtro de profundidad en un fluido que tenga un pH de alrededor de 4,0 y alrededor de 8,5, entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,4, entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,2, entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,0, entre alrededor de 4,0 y alrededor de 8,0, entre alrededor de 4,0 y

[illegible]

[illegible]

El fluido que incluye el anticuerpo recombinante que se hace pasar a través de un filtro de profundidad puede incluir una concentración de anticuerpo recombinante entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 25 mg/ml (por ejemplo, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 22,5 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 20,0 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 17,5 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 15,0 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 12,5 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 8 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 6 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 5 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 4 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 3,5 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 3,0 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 2,5 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 2,0 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 1,5 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 1,0 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 0,5 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 0,25 mg/ml, entre alrededor de 0,01 mg/ml y alrededor de 0,1 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 12,5 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 10,0 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 8,0 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 6,0 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 5,0 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 4,0 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 3,5 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 3,0 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 2,5 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 2,0 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 1,5 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 1,0 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 0,5 mg/ml, o entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 0,25 mg/ml).

Un fluido que incluye el anticuerpo recombinante se puede hacer pasar a través del filtro de profundidad a un caudal de entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 400 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 390 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 380 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 360 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 340 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 320 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 300 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 280 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 260 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 240 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 220 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 200 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 180 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 160 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 140 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 120 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 25 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 100 l/m<sup>2</sup>/h, entre

[illegible]

alrededor de 360 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 220 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 340 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 220 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 320 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 220 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 300 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 220 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 280 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 220 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 260 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 220 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 240 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 240 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 400 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 240 l/m<sup>2</sup>/h y  
 5    alrededor de 380 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 240 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 360 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 240 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 340 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 240 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 320 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 240 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 300 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 240 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 280 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 240 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 260 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 260 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 400 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 260 l/m<sup>2</sup>/h y  
 10    alrededor de 380 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 260 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 360 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 260 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 340 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 260 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 320 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 260 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 300 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 260 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 280 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 280 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 400 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 280 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 380 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 280 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 360 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 280 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 340 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 280 l/m<sup>2</sup>/h y  
 15    alrededor de 320 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 280 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 300 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 300 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 400 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 300 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 380 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 300 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 360 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 300 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 340 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 300 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 320 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 320 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 400 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 320 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 380 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 320 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 360 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 320 l/m<sup>2</sup>/h y  
 20    alrededor de 340 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 340 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 400 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 340 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 380 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 340 l/m<sup>2</sup>/h y alrededor de 360 l/m<sup>2</sup>/h, entre alrededor de 360 l/m<sup>2</sup>/h y  
 alrededor de 400 l/m<sup>2</sup>/h, para retener de forma selectiva los agregados de proteínas solubles, tales como los dímeros  
 de proteínas y los oligómeros de proteínas superiores (tales como los agregados de anticuerpos recombinantes  
 solubles). Esta etapa de filtración se realiza usando un filtro de profundidad que incluye un medio de filtración de,  
 por ejemplo, sílice, una o más capas de un medio fibroso, una o más capas de membranas microporosas cargadas o  
 modificadas en la superficie, o un lecho pequeño de medios cromatográficos. Un filtro de profundidad puede tener, por  
 25    ejemplo, un área de superficie de membrana de entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 32000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor  
 de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 31000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 30000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup>  
 y alrededor de 29000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 28000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor  
 30    de 27000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 26000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 25000  
 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 24000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 23000 cm<sup>2</sup>, entre  
 alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 22000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 21000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor  
 de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 20000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 19000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup>  
 y alrededor de 18000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 17000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor  
 35    de 16000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 15000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 14000  
 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 13000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 12000 cm<sup>2</sup>, entre  
 alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 11000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 10000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor  
 de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 9000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 8000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y  
 40    alrededor de 7000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 6000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de  
 5000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 4000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 3000 cm<sup>2</sup>,  
 entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 2000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 1500 cm<sup>2</sup>, entre alrededor  
 de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 1020 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 1000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y  
 alrededor de 500 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10 cm<sup>2</sup> y alrededor de 75 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de  
 45    25000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 24000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 23000  
 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 22000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 21000 cm<sup>2</sup>,  
 entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 20000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 19000 cm<sup>2</sup>, entre  
 alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 18000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 17000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor  
 de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 16000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 15000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100  
 cm<sup>2</sup> y alrededor de 14000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 13000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y  
 50    alrededor de 12000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 11000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor  
 de 10000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 9000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 8000  
 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 7000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 6000 cm<sup>2</sup>, entre  
 alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 5000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 4000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor  
 de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 3000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 2000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100  
 55    cm<sup>2</sup> y alrededor de 1000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 cm<sup>2</sup> y alrededor de 500 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 500 cm<sup>2</sup> y  
 alrededor de 25000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 500 cm<sup>2</sup> y alrededor de 24000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 500 cm<sup>2</sup> y alrededor  
 de 23000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 500 cm<sup>2</sup> y alrededor de 22000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 500 cm<sup>2</sup> y alrededor de 21000  
 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 500 cm<sup>2</sup> y alrededor de 20000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 500 cm<sup>2</sup> y alrededor de 19000 cm<sup>2</sup>,  
 entre alrededor de 500 cm<sup>2</sup> y alrededor de 18000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 500 cm<sup>2</sup> y alrededor de 17000 cm<sup>2</sup>, entre  
 60    alrededor de 500 cm<sup>2</sup>

de 500 cm<sup>2</sup> y alrededor de 1000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 25000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 24000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 23000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 22000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 21000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 20000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 19000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 18000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 17000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 16000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 15000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 14000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 13000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 12000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 11000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 10000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 9000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 8000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 7000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 6000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 5000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 4000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 3000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 1000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 2000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 25000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 24000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 23000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 22000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 21000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 20000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 19000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 18000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 17000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 16000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 15000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 14000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 13000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 12000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 11000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 10000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 9000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 8000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 7000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 6000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 5000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 5000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 25000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 24000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 23000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 2200 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 21000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 20000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 19000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 18000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 17000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 16000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 15000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 14000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 13000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 12000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 10000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 11000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 15000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 25000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 15000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 24000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 15000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 23000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 15000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 22000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 15000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 21000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 15000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 20000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 15000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 19000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 15000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 18000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 15000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 17000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 15000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 16000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 15000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 15000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 20000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 25000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 20000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 24000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 20000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 23000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 20000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 22000 cm<sup>2</sup>, entre alrededor de 20000 cm<sup>2</sup> y alrededor de 21000 cm<sup>2</sup>, o alrededor de 25 cm<sup>2</sup>. En algunos ejemplos, dos o más filtros de profundidad se conectan de forma fluida a un colector para aumentar la cantidad de anticuerpo recombinante que se hace pasar a través de un filtro de profundidad en una o más etapas de un procedimiento de purificación.

La etapa de hacer pasar el anticuerpo recombinante a través de un filtro de profundidad puede dar como resultado una eliminación sustancialmente completa de los agregados de proteínas solubles. Por ejemplo, la etapa de hacer pasar el anticuerpo recombinante a través de un filtro de profundidad puede proporcionar un filtrado que incluye el anticuerpo recombinante purificado y está sustancialmente libre (tal como alrededor de o al menos 90% libre, alrededor de o al menos 90,5% libre, alrededor de o al menos al menos 91,0% libre, alrededor de o al menos 91,5% libre, alrededor de o al menos 92,0% libre, alrededor de o al menos 92,5% libre, alrededor de o al menos 93,0% libre, alrededor de o al menos 93,5% libre, alrededor de o al menos 94,0%, alrededor de o al menos 94,5% libre, alrededor de o al menos 95,0% libre, alrededor de o al menos 95,5% libre, alrededor de o al menos 96,0% libre, alrededor de o al menos 96,5% libre, alrededor de o al menos 97,0% libre, alrededor de o al menos 97,5% libre, alrededor de o al menos 98,0% libre, alrededor de o al menos 98,5% libre, alrededor de o al menos 99,0% libre, alrededor de o al menos 99,5% libre, o alrededor de o al menos 99,8% libre). El filtro de profundidad puede proporcionar un filtrado que incluye el anticuerpo recombinante purificado y agregados de proteínas solubles no detectables.

Los métodos para detectar el nivel o la cantidad de agregados de proteínas son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la cromatografía de exclusión por tamaños, la cromatografía en gel nativo (no desnaturizante), la ultracentrifugación analítica (AUC), el fraccionamiento de flujo de campo (FFF), y la dispersión dinámica de luz (DLS) se pueden usar para detectar la cantidad de agregados de proteínas solubles presentes en el filtrado del filtro de profundidad.

Se puede usar un modo de filtración a presión constante o un modo de operación de flujo constante. Un fluido que incluye un anticuerpo recombinante puede ser retenido por un depósito presurizado y bombeado a través de un filtro de profundidad por la presión en el depósito. El fluido se somete a un modo de filtración de flujo normal, siendo retenidos los agregados por el filtro de profundidad, y se descarga un fluido libre de agregados como filtrado. El filtrado se puede pasar a través de un conducto para el procesamiento aguas abajo, tal como una o más operaciones unitarias. Al operar de esta manera, los agregados de proteínas solubles son retenidos por el filtro de profundidad. Alternativamente, se podría usar una bomba ubicada entre el depósito y el filtro de profundidad, para crear una presión

constante y mantener un flujo constante a través del filtro de profundidad. El fluido que incluye un anticuerpo recombinante se somete a un modo de filtración de flujo normal, siendo retenidos los agregados por el filtro de profundidad, y se descarga un fluido libre de agregados como el filtrado del filtro de profundidad. El filtrado se puede pasar a través de un conducto para su procesamiento posterior aguas abajo.

- 5 Se describen aquí filtros de profundidad no limitativos que se pueden usar para eliminar agregados, y se conocen en la técnica filtros de profundidad adicionales que se pueden usar. Los filtros de profundidad adecuados representativos incluyen aquellos formados a partir de medios fibrosos formados por sílice, fibras celulósicas, fibras sintéticas o mezclas de las mismas, tales como filtros CUM® Zeta PLUS® Delipid (3M, St. Paul, MN), filtros CUNO® Emphaze AEX (3M, St. Paul, MN), filtros CUNO® 90ZA08A (3M, St. Paul, MN), filtros CUNO® DELI08A Delipid (3M, St. Paul, MN),  
 10 filtros Millipore XOHC (EMD Millipore, Billerica, MA), almohadillas MILLISTAK® (EMD Millipore, Billerica, MA), membranas microporosas que están cargadas o tienen una química de superficie (tal como hidrofilia o hidrofobia, o una carga positiva o negativa como se enseña en las patentes U.S. n.º 5.629.084 y 4.618.533) hechas de un material seleccionado del grupo que consiste en celulosa regenerada, polietersulfona, poliarilsulfona, polisulfona, poliimida, poliamida o difluoruro de polivinilideno (PVDF), tales como membrana DURAPORE® cargada, membrana  
 15 DURAPORE® hidrófoba, membrana AERVENT® hidrófoba, y membrana cargada cuaternaria INTERCEPT™ Q, todas disponibles de EMD Millipore, Billerica, MA.

Una o más operaciones unitarias

- Cualquiera de los métodos descritos aquí puede incluir, entre la etapa de captura y la etapa de llevar a cabo la filtración viral (por ejemplo, usando cualquiera de los métodos para llevar a cabo la filtración viral descritos aquí), la etapa de  
 20 llevar a cabo una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, o cinco) operaciones unitarias en el anticuerpo recombinante, por ejemplo una o más operaciones unitarias seleccionadas del grupo de filtración (por ejemplo, ultrafiltración/diafiltración para concentrar el anticuerpo recombinante en un fluido), purificación del anticuerpo recombinante, pulido del anticuerpo recombinante, inactivación viral, filtración de profundidad, ajuste (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) de uno o ambos del pH y la concentración iónica de un fluido que incluye el anticuerpo  
 25 recombinante, y prefiltración. Los métodos descritos aquí pueden incluir, entre la etapa de captura y la etapa de filtración viral, la etapa de llevar a cabo una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, o cinco) operaciones unitarias en el anticuerpo recombinante, por ejemplo una o más operaciones unitarias del grupo de ultrafiltración/diafiltración para concentrar una proteína recombinante en un fluido, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, pulido de la proteína recombinante, inactivación viral, ajuste de pH, ajuste de fuerza iónica, ajuste tanto del  
 30 pH como de la fuerza iónica de un fluido que incluye la proteína recombinante, filtración de profundidad, y prefiltración. Los métodos pueden incluir, entre la etapa de captura y la etapa de filtración viral, la realización de operaciones unitarias secuenciales de pulido (por ejemplo, llevando a cabo cromatografía de interacción hidrófoba), inactivación viral, ultrafiltración/diafiltración para concentrar el anticuerpo recombinante, filtración de profundidad, y prefiltración (por ejemplo, usando un prefiltro Sartorius Viroart® Max).

- 35 Los métodos descritos aquí pueden incluir además llevar a cabo una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, o cinco) operaciones unitarias antes de la etapa de captura, por ejemplo una o más operaciones unitarias seleccionadas del grupo de clarificación de un medio de cultivo, filtración (por ejemplo, ultrafiltración/diafiltración para concentrar un anticuerpo recombinante en un fluido), inactivación viral, purificación, y ajuste (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) uno o ambos del pH y la concentración iónica de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante. Los  
 40 métodos descritos aquí pueden incluir además llevar a cabo una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, o cinco) operaciones unitarias antes de la etapa de captura, por ejemplo una o más operaciones unitarias seleccionadas del grupo de ultrafiltración/diafiltración para concentrar el anticuerpo recombinante en un fluido, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, pulido del anticuerpo recombinante, inactivación viral, ajuste del pH, ajuste de la fuerza iónica, y ajuste tanto del pH como de la fuerza iónica de un fluido que incluye el  
 45 anticuerpo recombinante. Los métodos pueden incluir además, antes de la etapa de captura, las etapas secuenciales de clarificación de los medios de cultivo, ultrafiltración/diafiltración para concentrar el anticuerpo recombinante, e inactivación viral.

- Se pueden llevar a cabo una o más operaciones unitarias después de la etapa de inactivación viral, por ejemplo una o más operaciones unitarias seleccionadas del grupo de purificación del anticuerpo recombinante, pulido del  
 50 anticuerpo recombinante, ajuste (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) uno o ambos del pH y la concentración iónica de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante purificado, o haciendo pasar el fluido a través de un filtro de virus adicional. La operación unitaria de filtración viral puede ocurrir inmediatamente después de la etapa de hacer pasar el anticuerpo recombinante a través del filtro de profundidad, o inmediatamente después de la etapa de hacer pasar el anticuerpo recombinante a través de un prefiltro.

- 55 Purificación y pulido de la proteína recombinante

- Los métodos descritos aquí pueden incluir una etapa de purificación del anticuerpo recombinante usando al menos una columna de cromatografía que puede usarse para llevar a cabo la operación unitaria de purificación de una  
 60 proteína recombinante. Los métodos descritos aquí pueden incluir una etapa de pulido del anticuerpo recombinante usando al menos una columna de cromatografía o una membrana cromatográfica que puede usarse para llevar a cabo la operación unitaria de pulido de la proteína recombinante.

La al menos una columna de cromatografía para purificar el anticuerpo recombinante puede incluir una resina que utiliza un mecanismo de captura (tal como cualquiera de los mecanismos de captura descritos aquí o conocidos en la técnica), o una resina que puede usarse para llevar a cabo cromatografía de intercambio aniónico, de intercambio catiónico, o de tamiz molecular. La al menos una columna de cromatografía o membrana cromatográfica para purificar el anticuerpo recombinante puede incluir una resina que se puede usar para llevar a cabo cromatografía de intercambio aniónico, de intercambio catiónico, o de tamiz molecular (tal como cualquiera de las resinas ejemplares para llevar a cabo cromatografía de intercambio aniónico, de intercambio catiónico, o de tamiz molecular conocidas en la técnica).

El tamaño, la forma y el volumen de la al menos una columna de cromatografía para purificar el anticuerpo recombinante, y/o el tamaño y la forma de la al menos una columna de cromatografía o membrana cromatográfica para purificar el anticuerpo recombinante pueden ser cualquier combinación de los tamaños, formas y volúmenes ejemplares de columnas de cromatografía o membranas cromatográficas descritas aquí o conocidas en la técnica. Purificar o pulir un anticuerpo recombinante puede incluir, por ejemplo, las etapas de cargar, lavar, eluir y equilibrar al menos una columna de cromatografía o membrana cromatográfica usada para llevar a cabo la unidad de operación de purificación o pulido del anticuerpo recombinante. Normalmente, el amortiguador de elución que sale de una columna de cromatografía o membrana cromatográfica usada para la purificación incluye el anticuerpo recombinante. Normalmente, el amortiguador de carga y/o lavado que sale de una columna de cromatografía o membrana cromatográfica usada para el pulido incluye el anticuerpo recombinante.

Por ejemplo, el tamaño de la columna de cromatografía para purificar el anticuerpo recombinante puede tener un volumen de, por ejemplo, entre alrededor de 1,0 ml y alrededor de 650 l (por ejemplo, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 600 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 550 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 500 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 450 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 400 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 350 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 300 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 250 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 200 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 150 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 100 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 50 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 10 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 1,0 l, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 900 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 800 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 700 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 600 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 500 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 400 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 300 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 200 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 180 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 160 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 140 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 120 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 100 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 80 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 60 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 40 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 30 ml, o entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 25 ml).

El caudal lineal del fluido que incluye el anticuerpo recombinante a medida que se carga en la al menos una columna de cromatografía para purificar el anticuerpo recombinante puede ser, por ejemplo, entre 50 cm/hora y alrededor de 600 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 550 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 500 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 450 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 400 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 350 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 300 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 250 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 200 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 150 cm/hora, o entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 100 cm/hora (por ejemplo, para una columna de cromatografía que tenga un diámetro de entre alrededor de 100 cm y alrededor de 200 cm). La concentración del anticuerpo recombinante cargado en la columna de cromatografía para purificar el anticuerpo recombinante puede ser, por ejemplo, entre alrededor de 0,05 mg/ml y alrededor de 90 mg/ml de anticuerpo recombinante (por ejemplo, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 90 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 80 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 70 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 60 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 50 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 40 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 30 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 20 mg/ml, entre 0,5 mg/ml y alrededor de 20 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 15 mg/ml, entre alrededor de 0,5 mg/ml y alrededor de 15 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml, o entre alrededor de 0,5 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml de anticuerpo recombinante). La resina en la al menos una columna de cromatografía para purificar puede ser una resina de cromatografía de intercambio aniónico o de intercambio catiónico. La resina en la al menos una columna de cromatografía o membrana cromatográfica que se usa para llevar a cabo la operación unitaria de purificación puede ser una resina de intercambio catiónico.

Después de la carga del anticuerpo recombinante, la al menos una columna cromatográfica o membrana cromatográfica se lava con al menos un amortiguador de lavado. Como se puede apreciar en la técnica, el al menos un (por ejemplo, dos, tres, o cuatro) amortiguador de lavado está destinado a eluir todas las proteínas que no son la proteína recombinante de la al menos una columna de cromatografía, sin perturbar la interacción del anticuerpo recombinante con la resina o eluyendo de otro modo el anticuerpo recombinante.

El amortiguador de lavado se puede hacer pasar a través de la al menos una columna de cromatografía a un caudal lineal de, por ejemplo, entre 50 cm/hora y alrededor de 600 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 550 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 500 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 450 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 400 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 350 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 300 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor

de 250 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 200 cm/hora, entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 150 cm/hora, o entre alrededor de 50 cm/hora y alrededor de 100 cm/hora (por ejemplo, para una columna de cromatografía que tenga un diámetro de entre alrededor de 100 cm y alrededor de 200 cm). El volumen de amortiguador de lavado usado (tal como el volumen total combinado de amortiguador de lavado usado cuando se usa más de un amortiguador de lavado) puede estar entre alrededor de 1X volumen de columna (CV) y alrededor de 10X CV, entre alrededor de 1X CV y alrededor de 9X CV, alrededor de 1X CV y alrededor de 8X CV, alrededor de 1X CV y alrededor de 7X CV, alrededor de 1X CV y alrededor de 6X CV, alrededor de 2X CV y alrededor de 10X CV, alrededor de 3X CV y alrededor de 10X CV, alrededor de 4X CV y alrededor de 10X CV, alrededor de 2,5 X CV y alrededor de 5,0X CV, alrededor de 5X CV y alrededor de 10X CV, o alrededor de 5X CV y alrededor de 8X CV). El tiempo total del lavado puede estar entre alrededor de 2 minutos y alrededor de 5 horas (por ejemplo, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 4,5 horas, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 4,0 horas, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 3,5 horas, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 3,0 horas, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 2,5 horas, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 2,0 horas, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 1,5 horas, entre alrededor de 10 minutos y alrededor de 1,5 horas, entre alrededor de 10 minutos y alrededor de 1,25 horas, entre alrededor de 20 minutos y alrededor de 1,25 horas, entre alrededor de 30 minutos y alrededor de 1 hora, entre alrededor de 2 minutos y 10 minutos, entre alrededor de 2 minutos y 15 minutos, o entre alrededor de 2 minutos y 30 minutos).

Después del lavado de la al menos una columna cromatográfica para purificar el anticuerpo recombinante, el anticuerpo recombinante se eluye haciendo pasar un amortiguador de elución a través de la columna. El amortiguador de elución se puede hacer pasar a través de la columna que se puede usar para llevar a cabo la operación unitaria de purificación del anticuerpo recombinante a un caudal lineal de, por ejemplo, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 600 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 550 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 500 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 450 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 400 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 350 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 300 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 250 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 200 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 150 cm/hora, o entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 100 cm/hora (por ejemplo, para una columna de cromatografía que tenga un diámetro de entre alrededor de 100 cm y alrededor de 200 cm). El volumen de amortiguador de elución usado para eluir el anticuerpo recombinante de cada una de la al menos una columna cromatográfica para purificar el anticuerpo recombinante puede estar entre alrededor de 1X volumen de columna (CV) y alrededor de 10X CV, entre alrededor de 1X CV y alrededor de 9X CV, entre alrededor de 1X CV y alrededor de 8X CV, entre alrededor de 1X CV y alrededor de 7X CV, alrededor de 1X CV y alrededor de 6X CV, alrededor de 1X CV y alrededor de 5X CV, alrededor de 1X CV y alrededor de 4X CV, alrededor de 2X CV y alrededor de 10X CV, alrededor de 3X CV y alrededor de 10X CV, alrededor de 4X CV y alrededor de 10X CV, alrededor de 5X CV y alrededor de 10X CV, o alrededor de 5X CV y alrededor de 9X CV. El tiempo total de elución puede estar entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 3 horas, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 2,5 horas, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 2,0 horas, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 1,5 horas, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 1,5 horas, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 1,25 horas, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 1,25 horas, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 1 hora, entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 40 minutos, entre alrededor de 10 minutos y alrededor de 40 minutos, entre alrededor de 20 minutos y alrededor de 40 minutos, o entre alrededor de 30 minutos y 1,0 hora. Los ejemplos no limitativos de amortiguadores de elución que se pueden usar en estos métodos dependerán de la resina y/o el anticuerpo terapéutico. Por ejemplo, un amortiguador de elución puede incluir una concentración diferente de sal (por ejemplo, una concentración de sal aumentada), un pH diferente (por ejemplo, una concentración de sal aumentada o disminuida), o una molécula que competirá con el anticuerpo recombinante para unirse a la resina. Los ejemplos de dichos amortiguadores de elución para cada uno de los ejemplos de mecanismos de captura descritos aquí son bien conocidos en la técnica.

Después de la elución, y antes de que el siguiente volumen de fluido que incluye un anticuerpo recombinante se pueda cargar en la al menos una columna cromatográfica, la al menos una columna cromatográfica o membrana cromatográfica debe equilibrarse usando un amortiguador de regeneración. El amortiguador de regeneración se puede hacer pasar a través de la columna de cromatografía a un caudal lineal de, por ejemplo, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 600 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 550 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 500 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 450 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 400 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 350 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 300 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 250 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 200 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 150 cm/hora, o entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 100 cm/hora (por ejemplo, para una columna de cromatografía que tenga un diámetro de entre alrededor de 100 cm y alrededor de 200 cm). El volumen del amortiguador de regeneración usado para el equilibrado puede ser, por ejemplo, entre alrededor de 1X volumen de columna (CV) y alrededor de 10X CV, entre alrededor de 1X CV y alrededor de 9X CV, entre alrededor de 1X CV y alrededor de 8X CV, entre alrededor de 1X CV y alrededor de 7X CV, entre alrededor de 1X CV y alrededor de 6X CV, entre alrededor de 2X CV y alrededor de 10X CV, entre alrededor de 3X CV y alrededor de 10X CV, entre alrededor de 2X CV y alrededor de 5X CV, entre alrededor de 2,5X CV y alrededor de 7,5X CV, entre alrededor de 4X CV y alrededor de 10X CV, entre alrededor de 5X CV y alrededor de 10X CV, o entre alrededor de 5X CV y alrededor de 10X CV. La concentración de anticuerpo recombinante en un fluido usado para llevar a cabo la operación unitaria de purificación del anticuerpo recombinante puede estar entre

alrededor de 0,05 mg/ml y alrededor de 90 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 90 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 80 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 70 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 60 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 50 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 40 mg/ml, entre alrededor de 2,5 mg/ml y alrededor de 7,5 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 30 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 20 mg/ml, entre 0,5 mg/ml y alrededor de 20 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 15 mg/ml, entre alrededor de 0,5 mg/ml y alrededor de 15 mg/ml, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml, o entre alrededor de 0,5 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml de anticuerpo recombinante.

La al menos una columna de cromatografía o membrana de cromatografía que se puede usar para llevar a cabo la operación unitaria de pulido del anticuerpo recombinante puede incluir una resina que se puede usar para llevar a cabo cromatografía de intercambio catiónico, de intercambio aniónico, hidrófoba, de modo mixto, o de tamiz molecular. Como puede apreciarse en la técnica, el pulido puede incluir las etapas de cargar, seguir y regenerar la columna de cromatografía o la membrana cromatográfica. Por ejemplo, cuando se usan las etapas de carga, seguimiento y regeneración para llevar a cabo el pulido, el anticuerpo recombinante no se une a la resina en la al menos una columna de cromatografía o membrana de cromatografía, y la proteína recombinante se eluye de la columna de cromatografía o membrana cromatográfica en las etapas de carga y seguimiento, y la etapa de regeneración se usa para eliminar cualquier impureza de la columna de cromatografía o membrana cromatográfica. A continuación se describen caudales lineales y volúmenes de amortiguador ejemplares que se usarán en cada una de las etapas de carga, seguimiento y regeneración.

El tamaño, la forma y el volumen de la columna de cromatografía o la membrana de cromatografía para pulir el anticuerpo recombinante pueden ser cualquier combinación de los tamaños, formas y volúmenes ejemplares de las columnas de cromatografía o membranas cromatográficas descritas aquí. Por ejemplo, el tamaño de la al menos una columna de cromatografía o membrana cromatográfica puede tener un volumen entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 650 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 600 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 550 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 500 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 450 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 400 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 350 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 300 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 250 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 200 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 150 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 100 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 50 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 25 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 10 l, entre alrededor de 2,0 l y alrededor de 5 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 2 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 1 l, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 800 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 600 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 400 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 200 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 180 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 160 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 140 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 120 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 100 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 80 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 60 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 40 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 40 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 30 ml, entre alrededor de 5,0 ml y alrededor de 30 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 25 ml, entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 10 ml, o entre alrededor de 2,0 ml y alrededor de 5 ml. La al menos una columna de cromatografía también se puede describir en términos de su diámetro. Por ejemplo, la al menos una columna de cromatografía proporcionada aquí puede tener un diámetro de entre alrededor de 1 cm y alrededor de 200 cm, entre alrededor de 1 cm y alrededor de 180 cm, entre alrededor de 1 cm y alrededor de 160 cm, entre alrededor de 1 cm y alrededor de 140 cm, entre alrededor de 1 cm y alrededor de 120 cm, entre alrededor de 1 cm y alrededor de 100 cm, entre alrededor de 1 cm y alrededor de 80 cm, entre alrededor de 1 cm y alrededor de 60 cm, entre alrededor de 1 cm y alrededor de 40 cm, entre alrededor de 1 cm y alrededor de 20 cm, o entre alrededor de 1 cm y alrededor de 10 cm. El caudal lineal del fluido que incluye el anticuerpo recombinante a medida que se carga en la columna de cromatografía o membrana cromatográfica puede estar entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 600 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 550 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 500 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 450 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 400 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 350 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 300 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 250 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 200 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 150 cm/hora, o entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 100 cm/hora (por ejemplo, para una columna de cromatografía que tenga un diámetro de entre alrededor de 100 cm y alrededor de 200 cm). La cantidad de proteína recombinante cargada por ml de resina puede estar entre alrededor de 5 mg/ml y alrededor de 250 mg/ml, entre alrededor de 5 mg/ml y alrededor de 200 mg/ml, entre alrededor de 5 mg/ml y alrededor de 150 mg/ml, entre alrededor de 5 mg/ml y alrededor de 100 mg/ml, entre alrededor de 5 mg/ml y alrededor de 80 mg/ml, entre alrededor de 5 mg/ml y alrededor de 60 mg/ml, entre alrededor de 5 mg/ml y alrededor de 40 mg/ml, entre alrededor de 5 mg/ml y alrededor de 20 mg/ml, entre alrededor de 5 mg/ml y alrededor de 15 mg/ml, o entre alrededor de 5 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml. La resina en la columna de cromatografía o membrana cromatográfica para el pulido puede ser una resina de intercambio aniónico o de intercambio catiónico. La resina puede ser, por ejemplo, una resina de intercambio catiónico.

Después de la etapa de carga, se realiza una etapa de seguimiento. Por ejemplo, se puede hacer pasar un amortiguador de seguimiento a través de la al menos una membrana de cromatografía o membrana cromatográfica para recolectar el anticuerpo recombinante que no se une sustancialmente a la columna o membrana). En estos ejemplos, el amortiguador de seguimiento se puede hacer pasar a través de la columna o membrana a un caudal lineal

de entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 600 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 550 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 500 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 450 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 400 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 350 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 300 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 250 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 200 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 150 cm/hora, o entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 100 cm/hora (por ejemplo, para una columna de cromatografía que tenga un diámetro de entre alrededor de 100 cm y alrededor de 200 cm). El volumen del amortiguador de seguimiento usado puede estar entre alrededor de 1X volumen de columna (CV) y alrededor de 20X CV, entre alrededor de 1X CV y alrededor de 15X CV, entre alrededor de 5X CV y alrededor de 20X CV, entre alrededor de 1X CV y alrededor de 14X CV, alrededor de 1X CV y alrededor de 13X CV, alrededor de 1X CV y alrededor de 12X CV, alrededor de 1X CV y alrededor de 11X CV, alrededor de 2X CV y alrededor de 11X CV, alrededor de 3X CV y alrededor de 11X CV, alrededor de 4X CV y alrededor de 11X CV, alrededor de 2,5X CV y alrededor de 5,0X CV, alrededor de 5X CV y alrededor de 11X CV, o alrededor de 5X CV y alrededor de 10X CV. El tiempo total de seguimiento puede estar entre alrededor de 2 minutos y alrededor de 3 horas, entre alrededor de 2 minutos y alrededor de 2,5 horas, entre alrededor de 2 minutos y alrededor de 2,0 horas, entre alrededor de 2 minutos y alrededor de 1,5 horas, entre alrededor de 2 minutos y alrededor de 1,25 horas, entre alrededor de 2 minutos y alrededor de 5 minutos, entre alrededor de 2 minutos y alrededor de 10 minutos, entre alrededor de 2 minutos y alrededor de 4 minutos, entre alrededor de 30 minutos y alrededor de 1 hora, entre alrededor de 2 minutos y 15 minutos, o entre alrededor de 2 minutos y 30 minutos. La concentración combinada de anticuerpo recombinante presente en el filtrado que pasa por la columna en la etapa de carga y la etapa de seguimiento puede estar entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 250 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 200 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 150 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 100 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 80 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 70 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 60 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 50 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 40 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 2,5 mg/ml y alrededor de 7,5 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 30 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 20 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre 0,5 mg/ml y alrededor de 20 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 15 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,5 mg/ml y alrededor de 15 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml de anticuerpo recombinante, entre alrededor de 0,5 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml de anticuerpo recombinante, o entre alrededor de 1 mg/ml y alrededor de 5 mg/ml de anticuerpo recombinante.

Después de la etapa de seguimiento, y antes de que se cargue el siguiente volumen de fluido, la columna o membrana debe regenerarse usando un amortiguador de regeneración. El amortiguador de regeneración se puede hacer pasar a través de la columna o membrana para pulir a un caudal lineal de entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 600 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 550 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 500 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 450 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 400 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 350 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 300 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 250 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 200 cm/hora, entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 150 cm/hora, o entre alrededor de 25 cm/hora y alrededor de 100 cm/hora. El volumen de amortiguador de regeneración usado para regenerar puede estar entre alrededor de 1X volumen de columna (CV) y alrededor de 20X CV, entre alrededor de 1X CV y alrededor de 15X CV, entre alrededor de 5X CV y alrededor de 20X CV, entre alrededor de 1X CV y alrededor de 14X CV, alrededor de 1X CV y alrededor de 13X CV, alrededor de 1X CV y alrededor de 12X CV, alrededor de 1X CV y alrededor de 11X CV, alrededor de 2X CV y alrededor de 11X CV, alrededor de 3X CV y alrededor de 11X CV, alrededor de 4X CV y alrededor de 11X CV, alrededor de 2,5X CV y alrededor de 5,0X CV, alrededor de 5X CV y alrededor de 11X CV, o alrededor de 5X CV y alrededor de 10X CV.

En otros ejemplos, la una o más columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas usadas para llevar a cabo la operación unitaria de pulido incluyen una resina que une o retiene selectivamente las impurezas presentes en un fluido que incluye el anticuerpo recombinante, y en lugar de regenerar la una o más columnas y/o membranas, la una o más columnas y/o membranas se reemplazan (tal como por una columna o membrana similar) una vez que se ha alcanzado o está sustancialmente cerca de ser alcanzada la capacidad de unión de la resina en la una o más columnas y/o membranas.

#### Inactivación de los virus y filtración viral

La operación unitaria de inactivación de los virus presentes en un fluido que incluye el anticuerpo recombinante se puede llevar a cabo usando una columna de cromatografía, una membrana de cromatografía, o un tanque de retención que es capaz de incubar un fluido que incluye el anticuerpo recombinante a un pH de entre alrededor de 3,0 y 5,0, entre alrededor de 3,5 y alrededor de 4,5, entre alrededor de 3,5 y alrededor de 4,25, entre alrededor de 3,5 y alrededor de 4,0, entre alrededor de 3,5 y alrededor de 3,8, o alrededor de 3,75 durante un período de al menos 25 minutos, un período de entre alrededor de 30 minutos y 1,5 horas, un período de entre alrededor de 30 minutos y 1,25 horas, un período de entre alrededor de 0,75 horas y 1,25 horas, o un período de alrededor de 1 hora.

La operación unitaria de filtración viral se puede llevar a cabo usando cualquiera de los métodos para llevar a cabo la filtración viral descritos aquí.

Ajuste del pH y/o concentración iónica

- 5 Algunos métodos descritos aquí pueden incluir una o más etapas para ajustar (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) el pH y/o la concentración iónica de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante. Como se describe aquí, el pH y/o la concentración iónica de un fluido que incluye el anticuerpo recombinante se puede ajustar (por ejemplo, aumentar o disminuir) añadiendo un amortiguador al fluido (por ejemplo, mediante el uso de un depósito de ajuste de amortiguador en línea).

Formulación del anticuerpo recombinante purificado

- 10 Los métodos descritos aquí pueden incluir además una etapa de formular el anticuerpo recombinante en una composición farmacéutica. Por ejemplo, la formulación puede incluir la adición de un excipiente farmacéuticamente aceptable al anticuerpo recombinante purificado (por ejemplo, producido por cualquiera de los métodos de purificación o fabricación de un anticuerpo recombinante descritos aquí). La formulación puede incluir mezclar un excipiente farmacéuticamente aceptable con el anticuerpo recombinante purificado. Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, excipientes farmacéuticamente aceptables no naturales) son bien conocidos en la técnica. El anticuerpo recombinante purificado puede formularse para administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, o intramuscular.

## EJEMPLOS

- 20 A continuación se describen varios protocolos generales, que pueden usarse en cualquiera de los métodos descritos aquí y no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

### **Ejemplo 1. Efecto de diferentes prefiltros, pH, concentración de arginina, y concentración de cloruro de sodio en la filtración viral del anticuerpo BNJ441**

- 25 Se llevó a cabo una serie de experimentos para evaluar el efecto de diferentes prefiltros, pH, concentración de arginina, y concentración de cloruro de sodio en la filtración viral. En estos experimentos, una variedad de fluidos diferentes con un pH de entre 5,5 y 7,6, una concentración de cloruro de sodio de entre 65 mM y 300 mM, una concentración de L-arginina de 0 o 50 mM, y entre 2,91 mg/ml y 3,54 mg/ml de anticuerpo monoclonal BNJ441 que se había prefiltrado con un prefiltro de 0,1  $\mu\text{m}$  o con un prefiltro Sartorius Virosart® Max, se hicieron pasar cada uno a través de un filtro de virus Virosart® CPV. Se determinó la caída del flujo y el paso del flujo ( $\text{g}/\text{m}^2$ ) del filtro Virosart® CPV a medida que cada fluido se hizo pasar a través del filtro Virosart® CPV.

- 30 Los datos muestran que se observó mejor rendimiento del filtro de virus Virosart® CPV para fluidos que se prefiltraron con un prefiltro Sartorius Virosart® Max, y también en general, fluidos que tengan un pH de 5,5 y que no incluyan L-arginina, o fluidos que tengan un pH de 7,6 y que incluyan 25 mM de arginina (véanse las Figuras 1 y 2). Se usó un análisis estadístico para predecir el rendimiento a una caída del flujo del 50% para un filtro de virus Virosart® CPV (Figura 3) usando los parámetros enumerados en la Figura 4. Los datos en la Figura 4 también muestran que el tipo de prefiltro afecta significativamente el rendimiento del filtro de virus. Los datos en la Figura 5 muestran que el rendimiento promedio del filtro de virus a una caída del flujo del 50% aumenta en los fluidos que se han filtrado previamente con un prefiltro Sartorius Virosart® Max (en comparación con los fluidos que han sido prefiltrados usando un filtro de 0,1  $\mu\text{m}$ ).

- 40 La Figura 6 muestra la relación del rendimiento del filtro de virus a una caída del flujo del 50% con el radio hidrodinámico del anticuerpo monoclonal BNJ441. Los datos en la Figura 6 muestran que a medida que disminuye el radio hidrodinámico, aumenta el rendimiento del filtro de virus.

- 45 La Figura 7 muestra el rendimiento del filtro de virus a una caída del flujo del 50% para fluidos con un pH de 5,5, 6,5, o 7,5. Estos datos muestran que los fluidos que tienen un pH de 5,5 tienen un mejor rendimiento a través de un filtro de virus en comparación con los fluidos que tienen un pH de 6,5 o un pH de 7,5, teniendo los fluidos que tienen un pH de 6,5 el rendimiento más bajo a través del filtro de virus.

- 50 La Figura 8 muestra la relación del rendimiento del filtro de virus a una caída del flujo del 50% con la concentración de agente estabilizante en el fluido. Estos datos muestran que, en general, el rendimiento del filtro de virus aumenta a medida que aumenta la concentración de agente estabilizante en el fluido. Los datos en las Figuras 9 y 10 muestran que no existe una relación significativa entre el rendimiento del filtro de virus a una caída del flujo del 50% y la concentración de cloruro de sodio o el porcentaje de agregados de proteínas en el fluido, respectivamente. Los datos en la Figura 11 muestran que, a medida que aumenta la concentración promedio de partículas del fluido, disminuye el rendimiento del filtro de virus a una caída del flujo del 50%.

La Figura 12 muestra el efecto de la concentración de cloruro de sodio a pH 5,5, 6,5 o 7,6 sobre el rendimiento del filtro de virus a una caída del flujo del 50%. Estos datos muestran que aumentar las concentraciones de cloruro de

sodio de 50 mM a 300 mM aumenta el rendimiento del filtro de virus a pH 5,5, mientras que aumentar las concentraciones de cloruro de sodio de 50 mM a 300 mM disminuye el rendimiento del filtro de virus a pH 7,6.

La Figura 13 muestra el efecto de la concentración de cloruro de sodio a pH 5,5, 6,5 o 7,6 sobre el porcentaje de agregados proteicos. Los datos muestran que aumentar las concentraciones de cloruro de sodio a pH 5,5 da como resultado un aumento en el porcentaje de agregados de proteínas, mientras que aumentar las concentraciones de cloruro de sodio a pH 7,6 da como resultado una disminución en el porcentaje de agregados de proteínas.

La Figura 14 muestra el efecto de la concentración de cloruro de sodio, el pH del fluido y el tipo de prefiltro usado (prefiltro de 0,1  $\mu\text{m}$  o prefiltro Sartorius Virosart® Max) sobre el rendimiento del filtro de virus a una caída del flujo del 50%. Estos datos muestran que los fluidos prefiltrados con un prefiltro Sartorius Virosart® Max tienen valores de rendimiento de virus más altos en comparación con los fluidos prefiltrados con un prefiltro de 0,1  $\mu\text{m}$ . Para fluidos prefiltrados usando un prefiltro Sartorius Virosart® Max, los aumentos en la concentración de cloruro de sodio se correlacionaron con un mayor rendimiento del filtro de virus a pH 5,5, mientras que los aumentos en la concentración de cloruro de sodio se correlacionaron con una disminución del rendimiento del filtro de virus a pH 7,6.

Los datos en la Figura 15 muestran que a pH 5,5, aumentar las concentraciones de cloruro de sodio en el fluido se correlacionan con una disminución en el radio hidrodinámico del anticuerpo monoclonal BNJ441, mientras que a pH 7,6, aumentar las concentraciones de cloruro de sodio en el fluido solo se correlacionan modestamente con una disminución en el radio hidrodinámico del anticuerpo monoclonal BNJ441.

Los datos en la Figura 16 muestran que el radio hidrodinámico del anticuerpo monoclonal BNJ441 generalmente aumenta con el aumento del pH del fluido. Los datos en la Figura 17 muestran la relación entre el porcentaje de agregados en los fluidos con las concentraciones de cloruro de sodio en los fluidos.

La Figura 18 muestra las concentraciones óptimas de L-arginina que deben incluirse en un fluido que incluye el anticuerpo monoclonal BNJ441 para lograr un caudal de filtro de virus mayor que 750 g/m<sup>2</sup> (el área no sombreada en el gráfico).

Estos datos muestran que para fluidos que incluyen un anticuerpo que tiene al menos una histidina en una CDR de la cadena ligera o pesada (tal como el anticuerpo monoclonal BNJ441), un pH de entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,7 mejora el rendimiento del filtro de virus, y opcionalmente, que el ajuste (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) del fluido a una concentración de agente estabilizante de entre alrededor de 0 mM y alrededor de 25 mM puede aumentar aún más el rendimiento del filtro de virus. Los datos también indican que para fluidos que incluyen un anticuerpo que tiene al menos una histidina en una CDR de la cadena ligera o pesada (como el anticuerpo monoclonal BNJ441) y que tiene un pH de entre alrededor de 6,7 y alrededor de 8,5, el ajuste de la concentración del agente estabilizante del fluido entre alrededor de 10 mM y alrededor de 100 mM mejorará el rendimiento del filtro de virus. Además, para todos los fluidos, los datos muestran que el uso de un prefiltro Sartorius Virosart® Max mejora el rendimiento del filtro de virus.

## Ejemplo 2. Efecto del pH sobre la filtración viral del anticuerpo monoclonal BNJ441

Se llevó a cabo una serie de experimentos para evaluar el efecto del pH de un fluido que incluye 4 mg/ml de anticuerpo monoclonal BNJ441 sobre la filtración viral llevada a cabo usando un filtro viral Asahi Planova BioEx o un Asahi 20N. Cada fluido analizado contenía cloruro sódico 65 mM y tenía un pH de entre 7 y 8,5 (véase la Tabla 1 a continuación).

Tabla 1. Fluidos analizados que incluyen el anticuerpo monoclonal BNJ441

| Filtro | pH   | Concentración de sal (mM) | Concentración de producto (mg/ml) |
|--------|------|---------------------------|-----------------------------------|
| Bio EX | 7    | 65                        | 4                                 |
| Bio EX | 7,75 | 65                        | 4                                 |
| Bio EX | 8.5  | 65                        | 4                                 |
| 20N    | 7,75 | 65                        | 4                                 |

Los datos en las Figuras 19-22 muestran que el mejor flujo para el rendimiento se logró cuando un fluido que tiene un pH de 7,75 y que contenía cloruro de sodio 65 mM y 4 mg/ml de anticuerpo monoclonal BNJ441 se hizo pasar a través de un filtro viral Asahi 20N.

## Ejemplo 3 de referencia. Análisis estadístico para determinar factores importantes para la filtración viral de samalizumab

Se llevaron a cabo análisis estadísticos para determinar qué parámetros (factores) eran los más importantes para el rendimiento de samalizumab a través de un filtro de virus Sartorius Virosart® CPV. Los fluidos analizados en estos

experimentos incluyeron entre 5 mg/ml y 15 mg/ml de samalizumab y entre 75 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y tenían un pH de entre 5 y 6. Los fluidos analizados en este experimento se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2. Fluidos analizados que incluyen samalizumab

| pH  | Concentración de sal (mM) | Concentración de producto (mg/ml) |
|-----|---------------------------|-----------------------------------|
| 5   | 75                        | 5                                 |
| 5   | 75                        | 15                                |
| 5   | 300                       | 5                                 |
| 5   | 300                       | 15                                |
| 5,5 | 190                       | 10                                |
| 6   | 75                        | 5                                 |
| 6   | 75                        | 15                                |
| 6   | 300                       | 5                                 |
| 6   | 300                       | 15                                |

- 5 En la Figura 23 se muestra la relación entre el porcentaje de caída del flujo y el rendimiento del filtro de virus Virosart® CPV cuando cada fluido se hizo pasar a través del filtro de virus Virosart® CPV. Se llevaron a cabo análisis estadísticos para evaluar la relación del pH de cada fluido, la concentración de cloruro de sodio de cada fluido, y la concentración de samalizumab de cada fluido sobre el rendimiento del filtro de virus (Figura 24). Los análisis estadísticos muestran que el rendimiento del filtro de virus aumenta a medida que el pH aumenta entre pH 5 y pH 6, que el rendimiento del filtro de virus aumenta a medida que la concentración de sodio aumenta entre 75 mM y 300 mM, y que el rendimiento del filtro de virus disminuye a medida que la concentración de samalizumab aumenta entre 5 mg/ml y 15 mg/ml.

**Ejemplo 4 de referencia. Análisis estadísticos para determinar factores importantes para la filtración viral del anticuerpo monoclonal BNJ383**

- 15 Se llevaron a cabo análisis estadísticos para determinar qué parámetros (factores) eran los más importantes para el rendimiento del anticuerpo monoclonal BNJ383 a través de un filtro de virus Sartorius Virosart® CPV o un filtro de virus Virosart HF. Los fluidos analizados en estos experimentos incluyeron 10 mg/ml de anticuerpo monoclonal BNJ383 y entre 80 mM y 300 mM de cloruro de sodio, y tenían un pH de entre 7 y 8,5. Los fluidos analizados en este experimento se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3. Fluidos analizados que incluyen el anticuerpo monoclonal BNJ383

| Tipo de filtro viral | pH   | Concentración de sal (mM) | Concentración de producto (mg/ml) |
|----------------------|------|---------------------------|-----------------------------------|
| HF                   | 7    | 80                        | 10                                |
| HF                   | 8,5  | 80                        | 10                                |
| HF                   | 7,75 | 190                       | 10                                |
| HF                   | 7    | 300                       | 10                                |
| HF                   | 8,5  | 300                       | 10                                |
| CPV                  | 7,75 | 80                        | 10                                |

- 20 Los datos muestran que la mejor caída del flujo en comparación con el rendimiento se logra cuando un fluido que incluye 10 mg/ml de anticuerpo monoclonal BNJ383 y 80 mM de cloruro de sodio, y que tiene un pH de 7, se hace pasar a través de un filtro de virus Virosart HF (Figura 25). Los análisis estadísticos de los datos para cada fluido muestran que el rendimiento del filtro de virus disminuye a medida que el pH del fluido aumenta entre 7 y 8,5, y que el rendimiento del filtro de virus disminuye cuando la concentración de cloruro de sodio aumenta entre 80 mM y 300 mM (Figura 26).

**Ejemplo 5 de referencia. Efecto de diferentes prefiltros sobre la filtración viral de eculizumab**

Se llevó a cabo una serie de experimentos para evaluar el efecto de la prefiltración usando varios prefiltros diferentes en la filtración viral aguas abajo de un fluido que incluye 7,1 mg/ml de eculizumab y 80 mM de cloruro de sodio, y que tiene un pH de 6,5, usando un filtro viral Virosart® CPV. Los diferentes prefiltros evaluados fueron: un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm y 0,5/0,1 µm, un prefiltro Sartorius Virosart® Max, un prefiltro Sartopore 2, prefiltro Sartobind STIC, prefiltro Sartobind Q, prefiltro Sartobind HIC Phenyl, o un prefiltro Sartobind S.

Los datos muestran que la mejor caída del flujo en comparación con el rendimiento del filtro de virus se produjo cuando un fluido que incluía 7,1 mg/ml de eculizumab y 80 mM de cloruro de sodio, y que tiene un pH de 6,5, se hizo pasar a través de un prefiltro Sartorius Virosart® Max antes de hacer pasar el fluido a través de un filtro de virus Virosart® CPV (Figura 27). Los datos también muestran que hacer pasar un fluido que incluye 7,1 mg/ml de eculizumab y 80 mM de cloruro de sodio, y que tiene un pH de 6,5, a través de un prefiltro Sartorius Virosart® Max también redujo significativamente el porcentaje de agregados de proteínas solubles en el fluido antes de que se haga pasar al filtro de virus Virosart® CPV (Figura 28). Los datos también muestran que hacer pasar un fluido que incluye XX mg/ml de eculizumab y 80 mM de cloruro de sodio, y que tiene un pH de 6,5, a través de un prefiltro Sartorius Virosart® Max también reduce la concentración de partículas insolubles en el fluido (compare los datos del conjunto de Q1 con los datos del conjunto de Sartorius Virosart® Max) (Figura 29).

Estos datos muestran que hacer pasar un fluido que incluye eculizumab a través de un prefiltro (por ejemplo, un prefiltro que incluye una membrana de poliamida, tal como prefiltro Sartorius Virosart® Max) reduce la concentración de agregados de proteínas solubles y partículas insolubles en el fluido, y aumenta el rendimiento de la filtración viral (ya que el fluido se hace pasar posteriormente a través de un filtro de virus, tal como un filtro de virus Virosart® CPV).

**Ejemplo 6 de referencia. Estudio de la variabilidad lote a lote del filtro de virus Virosart® CPV**

Se llevó a cabo un conjunto de experimentos para evaluar la variabilidad lote a lote del filtro de virus Virosart® CPV sobre el rendimiento de eculizumab. En estos experimentos, se evaluaron tres lotes diferentes del filtro de virus Virosart® CPV de 5 cm<sup>2</sup>, usando el mismo material de carga.

**Materiales y métodos**

El material de partida para estos experimentos se preparó llevando a cabo las siguientes etapas: capturando eculizumab a partir de un medio de cultivo clarificado concentrado usando cromatografía de Proteína A, llevando a cabo la inactivación viral a pH bajo, llevando a cabo la ultrafiltración y diafiltración, y llevando a cabo la cromatografía en Q Sepharose. El material de partida se hizo pasar entonces a través de un prefiltro en cada experimento (es decir, inmediatamente antes de hacerlo pasar a través de un filtro de virus Virosart® CPV).

En los experimentos, se filtraron 218 ml del material de partida a través de un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHC), y un prefiltro de 0,5 µm/0,1 µm (SHR). Cien ml del filtrado resultante se filtraron a través de un filtro de virus Virosart® CPV de 5 cm<sup>2</sup>, para determinar el rendimiento del filtro de eculizumab en fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 80 mM, pH 6,50. Los 100 ml restantes se procesaron sobre otro lote de filtro de virus Virosart® CPV hasta que el flujo se redujo a ~0% del valor inicial (Figura 30). El procedimiento se realizó dos veces más para evaluar tres lotes diferentes de filtros de virus Virosart® CPV por duplicado. La Tabla 4 enumera las condiciones de procesamiento para el ensayo del filtro de virus. Se monitorizaron el flujo del filtro de virus, la caída del flujo, y la presión de alimentación. Se evaluó la concentración de proteína del material de partida y del filtrado viral usando la absorbancia a 280 nm, y el nivel de agregados de proteínas solubles.

Tabla 4. Condiciones del procedimiento para evaluar la variabilidad lote a lote en filtros virales

| Parámetro                                     | Condición experimental                                  |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Amortiguador de equilibrado                   | fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 80 mM, pH 6,50 |
| Área de los prefiltros                        | 3,5 cm <sup>2</sup>                                     |
| Área del filtro CPV                           | 5 cm <sup>2</sup>                                       |
| Carga del prefiltro (l/m <sup>2</sup> )       | 623 (218 ml)                                            |
| Carga del filtro de virus (l/m <sup>2</sup> ) | 200                                                     |
| Volumen de carga                              | 100 ml                                                  |
| Presión de alimentación (psi)                 | 27-33                                                   |
| Seguimiento de amortiguador                   | 12,5 ml                                                 |

## Resultados

Los datos en las Figuras 31 y 32 muestran que existe una variabilidad significativa lote a lote en el flujo de filtros de virus Virosart® CPV, y también variabilidad significativa en filtros de virus Virosart® CPV del mismo lote.

#### 5 Ejemplo 7 de referencia. Estudio del efecto de los parámetros de carga del filtrado previo sobre el rendimiento del filtro de virus aguas abajo

Se llevó a cabo una serie de experimentos para evaluar el efecto de los parámetros de carga del prefiltro sobre el rendimiento de un filtro de virus Virosart® CPV aguas abajo.

## Materiales y métodos

- 10 El material de partida para estos experimentos se preparó llevando a cabo las siguientes etapas: capturando eculizumab a partir de un medio de cultivo clarificado concentrado usando cromatografía de Proteína A, llevando a cabo la inactivación viral a pH bajo, llevando a cabo la ultrafiltración y diafiltración, y llevando a cabo la cromatografía en Q Sepharose. El material de partida se prefiltró usando un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHC) y un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHR) en dos condiciones diferentes: 622 l/m<sup>2</sup> (218 ml fluyeron a través de los SHC de 3,5 cm<sup>2</sup> y SHR de 3,5 cm<sup>2</sup>) o 311 l/m<sup>2</sup> (109 ml a través de los SHC de 3,5 cm<sup>2</sup> y SHR de 3,5 cm<sup>2</sup>), y entonces se hicieron pasar 100 ml de cada filtrado (que incluye fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 80 mM, pH de 6,5) a través de un filtro de virus Virosart® CPV de 5 cm<sup>2</sup>, a 200 l/m<sup>2</sup>, con una presión de alimentación de 27 a 33 psi, y un seguimiento de amortiguador de 12,5 ml. Cada experimento se realizó por duplicado. Se midió el flujo a lo largo del tiempo del filtro de virus Virosart® CPV.

#### 20 Resultados

Los datos en las Figuras 33 y 34 muestran que no hubo una diferencia significativa en el rendimiento de los filtros de virus Virosart® CPV cuando los prefiltros se cargaron a 311 l/m<sup>2</sup> o 622 l/m<sup>2</sup>.

#### Ejemplo 8 de referencia. Estudio del efecto de la presión de alimentación sobre el rendimiento de los filtros de virus

- 25 Se llevó a cabo una serie de experimentos para determinar el efecto de la presión de alimentación sobre el rendimiento de los filtros de virus Virosart® CPV.

## Materiales y métodos

- 30 El material de partida para estos experimentos se preparó llevando a cabo las siguientes etapas: capturando eculizumab a partir de un medio de cultivo clarificado concentrado usando cromatografía de Proteína A, llevando a cabo la inactivación viral a pH bajo, llevando a cabo la ultrafiltración y diafiltración, y llevando a cabo la cromatografía en Q Sepharose. El material de partida se filtró usando un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHC) y un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHR), o un prefiltro Sartorius Virosart® Max (5 cm<sup>2</sup>), para producir un compuesto que incluía fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 80 mM, pH de 6,5, que entonces se filtró adicionalmente en línea con un filtro de virus Virosart® CPV de 5 cm<sup>2</sup>, con una presión de alimentación de 15 psi o 30 psi para experimentos de los prefiltros SHC/SHR, y 30 psi para el experimento del prefiltro Virosart Max. Cada experimento se llevó a cabo por duplicado. Se midió el flujo a lo largo del tiempo del filtro de virus Virosart® CPV.

## Resultados

- 40 Los datos en las Figuras 35 y 36 muestran que no hay una diferencia significativa en el rendimiento del filtro de virus Virosart® CPV cuando se carga usando diferentes presiones de entrada, y que hay una mejora significativa en el rendimiento del filtro de virus Virosart® CPV cuando se usa un prefiltro Sartorius Virosart® Max antes del filtro de virus Virosart® CPV. El tiempo de operación de la filtración viral se redujo significativamente con el prefiltro Virosart® Max.

#### Ejemplo 8 de referencia. Efecto de la concentración de proteínas durante la prefiltración sobre el rendimiento del filtro viral aguas abajo

- 45 Se llevó a cabo una serie de experimentos para evaluar el efecto de la concentración de proteínas durante la prefiltración sobre el rendimiento de un filtro de virus Virosart® CPV inmediatamente aguas abajo.

## Materiales y métodos

- 50 El material de partida para estos experimentos se preparó llevando a cabo las siguientes etapas: capturando eculizumab a partir de un medio de cultivo clarificado concentrado usando cromatografía de Proteína A, llevando a cabo la inactivación viral a pH bajo, llevando a cabo la ultrafiltración y diafiltración, y llevando a cabo la cromatografía en Q Sepharose. El material de partida (218 ml) que tiene una concentración de eculizumab de 4 mg/ml u 8 mg/ml se cargó a 623 l/m<sup>2</sup> en un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHC) y un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHR),

o un prefiltro Sartorius Virosart® Max (5 cm<sup>2</sup>), y entonces se hicieron pasar 100 ml de cada filtrado (que incluye fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 80 mM, pH de 6,5) a través de un filtro de virus Virosart® CPV de 5 cm<sup>2</sup>, a 200 l/m<sup>2</sup>, con una presión de alimentación de 27 a 33 psi y un seguimiento de amortiguador de 12,5 ml. Se midió el flujo a lo largo del tiempo del filtro de virus Virosart® CPV.

## 5 Resultados

Los datos en las Figuras 37 y 38 muestran que se produce un aumento significativo en el rendimiento volumétrico del filtro de virus Virosart® CPV cuando el prefiltro se carga con una menor concentración de eculizumab, y que hay una mejora significativa en el rendimiento del filtro de virus Virosart® CPV cuando se usa un prefiltro Sartorius Virosart® Max antes del filtro de virus Virosart® CPV.

## 10 Ejemplo 9 de referencia. Purificación de eculizumab usando prefiltración antes de la filtración viral

Se llevó a cabo un conjunto de experimentos para evaluar el efecto de diferentes prefiltros en un procedimiento de purificación de eculizumab que incluye el uso de un prefiltro inmediatamente antes de la filtración viral.

### Materiales y métodos

El material de partida para estos experimentos se preparó llevando a cabo las siguientes etapas: capturando eculizumab a partir de un medio de cultivo clarificado concentrado usando cromatografía de Proteína A, llevando a cabo la inactivación viral a pH bajo, llevando a cabo la ultrafiltración y diafiltración, y llevando a cabo la cromatografía en Q Sepharose. El material de partida se cargó con una presión de 30 psi y 623 l/m<sup>2</sup> en un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHC) y un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHR), o un prefiltro Sartorius Virosart® Max (5 cm<sup>2</sup>), y cada filtrado (que incluye fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 80 mM, pH de 6,5) se hizo pasar entonces a través de un filtro de virus Virosart® CPV de 5 cm<sup>2</sup>, a 200 l/m<sup>2</sup>, con una presión de alimentación de 30 psi, y se hicieron pasar 25 ml de un amortiguador de seguimiento a través del filtro de virus Virosart® CPV 60 minutos después de que el último eluato del prefiltro se haya hecho pasar a través del filtro de virus Virosart® CPV. Durante la filtración con el filtro de virus Virosart® CPV, si se alcanzaba una caída del flujo del 80%, la filtración se detenía durante 60 minutos, y el eluato del prefiltro cargado en el filtro de virus Virosart® CPV se diluyó 4 veces en amortiguador. Se midió el flujo a lo largo del tiempo del filtro de virus Virosart® CPV.

### Resultados

Los datos en las Figuras 39 y 40 muestran que se logró un rendimiento mejorado del filtro de virus Virosart® CPV cuando se usó un prefiltro Sartorius Virosart® Max antes del filtro de virus Virosart® CPV, y que la pausa y la dilución usadas cuando se alcanzaba una caída del flujo del 80% no eran necesarias cuando se usó un prefiltro Sartorius Virosart® Max antes del filtro de virus Virosart® CPV. Por el contrario, en uno de los dos experimentos en el que se usó un prefiltro Millipore 0,5/0,2 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHC), y un prefiltro 0,5 µm/0,1 µm de 3,5 cm<sup>2</sup> (SHR) como prefiltro, se alcanzó una caída del flujo del 80% y fue necesario usar la pausa de 60 minutos y la dilución cuádruple (Figuras 39 y 40; Experimento 1 - SHC/ SHR).

## 35 Ejemplo 10 de referencia. Uso de filtración de profundidad entre diferentes etapas de un procedimiento de purificación de eculizumab

Se llevó a cabo una serie de experimentos para evaluar el efecto de llevar a cabo una filtración de profundidad entre diferentes etapas de un procedimiento de purificación de proteínas recombinantes.

### Materiales y métodos

Se insertó una etapa de filtración de profundidad entre diferentes etapas del procedimiento de purificación de proteínas recombinantes de partida. El procedimiento de purificación de proteínas recombinantes de partida usa las etapas de preparación de un medio de cultivo clarificado, concentración de la proteína recombinante mediante ultrafiltración/diafiltración, inactivación viral con disolvente/detergente, captura de la proteína recombinante mediante cromatografía de proteína A (captura), pulido de la proteína recombinante, realización de la ultrafiltración/diafiltración, realización de la filtración viral, realización del pulido final de la proteína recombinante, y realización de la ultrafiltración/diafiltración (mostradas en la Figura 41A). Se llevó a cabo una etapa de filtración de profundidad, que incluye hacer pasar un fluido que incluye la proteína recombinante a través de un filtro CUNO Delipid, entre dos etapas diferentes en el procedimiento de purificación de proteínas recombinantes de partida (véanse las Figuras 41B a 41D). El impacto de llevar a cabo la etapa de filtración de profundidad en cada procedimiento ensayado se determinó detectando el flujo en un filtro de virus Virosart® CPV aguas abajo, y detectando el nivel de agregados de proteínas solubles y partículas de proteínas insolubles en la proteína recombinante purificada final al final del procedimiento de purificación ensayado.

En una segunda serie de experimentos, se evaluaron tres filtros de profundidad diferentes para determinar su capacidad para reducir los niveles de proteína de la célula hospedante. Uno de los tres filtros evaluados fue un filtro de profundidad que tenía propiedades aniónicas e hidrófobas (Filtro 2, que es un filtro CUNO Delipid). Alexion 1210 (también llamado BNJ441) se purificó usando un procedimiento de purificación con eculizumab como se muestra en

la Figura 41D, en el que el filtro de profundidad fue el filtro de profundidad que tenía propiedades aniónicas e hidrófobas (Filtro 2), y en el que la etapa de filtración de profundidad se realizó usando las condiciones originales o en condiciones optimizadas para maximizar la eliminación de impurezas mientras se mantiene un rendimiento superior al 85% de eculizumab. El filtro de profundidad que tiene propiedades aniónicas e hidrófobas (Filtro 2) también se evaluó para determinar si el nivel de virus pequeño murino (MMV) y virus de la leucemia murina xenotrófica (XMuLV) en un fluido podría reducirse haciendo pasar el fluido a través del filtro de profundidad.

#### Resultados

Los datos en las Figuras 42 y 43 muestran que se observó una mejora significativa en la eliminación de agregados y el contenido de partículas cuando se llevó a cabo una filtración de profundidad inmediatamente antes de la filtración viral. Los datos en las Figuras 44A y 44B muestran que un filtro de profundidad que tiene propiedades aniónicas e hidrófobas da como resultado una eliminación significativa de proteína de la célula hospedante y agregados de proteínas solubles (Filtro 2). Los datos en la Tabla 5 muestran el resultado de llevar a cabo una filtración de profundidad usando un filtro de profundidad que tiene propiedades aniónicas e hidrófobas sobre el nivel de MMV y XMuLV.

Tabla 5. Resultados del aclaramiento viral para la filtración de profundidad por adsorción

| Virus  | Log <sub>10</sub> Reducción |
|--------|-----------------------------|
| MMV    | 0,72 ±0,33                  |
| X-MuLV | 1,46 ±0,20                  |

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Alexion Pharmaceuticals, Inc.

<120> FILTRACIÓN DE VIRUS

<130> N421124EP

<140> 16716341.9

<141> 2016-03-23

<150> PCT/US2016/023746

<151> 2016-03-23

<150> 62/137,187

<151> 2015-03-23

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada de BNJ441

<400> 1

Gly His Ile Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Gln  
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena pesada de BNJ441

<400> 2

# ES 2 936 088 T3

|    |                                                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|--------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |                                                  | Glu | Ile | Leu | Pro | Gly | Ser | Gly | His | Thr | Glu | Tyr | Thr | Glu | Asn | Phe | Lys |
|    |                                                  | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|    |                                                  | Asp |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 5  | <210> 3                                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <211> 13                                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <212> PRT                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <213> Secuencia artificial                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 10 | <220>                                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <223> CDR3 de cadena pesada de BNJ441            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <400> 3                                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    |                                                  | Tyr | Phe | Phe | Gly | Ser | Ser | Pro | Asn | Trp | Tyr | Phe | Asp | Val |     |     |     |
|    |                                                  | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     |     |
| 15 | <210> 4                                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <211> 122                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <212> PRT                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <213> Secuencia artificial                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 20 | <220>                                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <223> Región variable de cadena pesada de BNJ441 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <400> 4                                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    |                                                  | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala |
|    |                                                  | 1   |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|    |                                                  | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | His | Ile | Phe | Ser | Asn | Tyr |
|    |                                                  |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |     |
|    |                                                  | Trp | Ile | Gln | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met |
|    |                                                  |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
|    |                                                  | Gly | Glu | Ile | Leu | Pro | Gly | Ser | Gly | His | Thr | Glu | Tyr | Thr | Glu | Asn | Phe |
|    |                                                  | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
|    |                                                  | Lys | Asp | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Thr | Ser | Thr | Val | Tyr |
|    |                                                  | 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
|    |                                                  | Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|    |                                                  |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
|    |                                                  | Ala | Arg | Tyr | Phe | Phe | Gly | Ser | Ser | Pro | Asn | Trp | Tyr | Phe | Asp | Val | Trp |
|    |                                                  |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
|    |                                                  | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |     |     |     |     |     |
|    |                                                  |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 25 | <210> 5                                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <211> 448                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <212> PRT                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <213> Secuencia artificial                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 30 | <220>                                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <223> Cadena pesada de BNJ441                    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <400> 5                                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

# ES 2 936 088 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | His | Ile | Phe | Ser | Asn | Tyr | 20  | 25  | 30  |     |
| Trp | Ile | Gln | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met | 35  | 40  | 45  |     |
| Gly | Glu | Ile | Leu | Pro | Gly | Ser | Gly | His | Thr | Glu | Tyr | Thr | Glu | Asn | Phe | 50  | 55  | 60  |     |
| Lys | Asp | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Thr | Ser | Thr | Val | Tyr | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | 85  | 90  | 95  |     |
| Ala | Arg | Tyr | Phe | Phe | Gly | Ser | Ser | Pro | Asn | Trp | Tyr | Phe | Asp | Val | Trp | 100 | 105 | 110 |     |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | 115 | 120 | 125 |     |
| Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | 130 | 135 | 140 |     |
| Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | 165 | 170 | 175 |     |
| Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | 180 | 185 | 190 |     |
| Val | Pro | Ser | Ser | Asn | Phe | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | 195 | 200 | 205 |     |
| His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Thr | Val | Glu | Arg | Lys | Cys | 210 | 215 | 220 |     |
| Cys | Val | Glu | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Pro | Val | Ala | Gly | Pro | Ser | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | 245 | 250 | 255 |     |
| Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | 260 | 265 | 270 |     |
| Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | 275 | 280 | 285 |     |

# ES 2 936 088 T3

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

- 5 <210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> CDR1 de cadena ligera de BNJ441  
 <400> 6  
 Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn  
 1 5 10  
 15 <210> 7  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> CDR2 de cadena ligera de BNJ441  
 <400> 7  
 Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp  
 1 5  
 25 <210> 8  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> CDR3 de cadena ligera de BNJ441

&lt;400&gt; 8

Gln Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu Thr  
1 5

&lt;210&gt; 9

5 &lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

10 &lt;223&gt; Región variable de cadena ligera de BNJ441

&lt;400&gt; 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

15 &lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

20 &lt;223&gt; Cadena ligera de BNJ441

&lt;400&gt; 10

# ES 2 936 088 T3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
          20           25           30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu
          85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130          135          140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180          185          190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195          200          205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210

```

<210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> CDR1 de cadena pesada de eculizumab

<400> 11  
 Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Gln  
 1 5 10

<210> 12  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> CDR2 de cadena pesada de eculizumab

5 <400> 12  
           Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Glu Tyr Thr Glu Asn Phe Lys  
           1                  5                  10                  15  
           Asp

10 <210> 13  
       <211> 13  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial

15 <220>  
       <223> CDR3 de cadena pesada de eculizumab

      <400> 13  
                   Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp Tyr Phe Asp Val  
                   1                  5                  10

20 <210> 14  
       <211> 122  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial

25 <220>  
       <223> Región variable de cadena pesada de eculizumab

      <400> 14  
           Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
           1                  5                  10                  15  
           Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Tyr  
                   20                  25                  30  
           Trp Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                   35                  40                  45  
           Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Glu Tyr Thr Glu Asn Phe  
                   50                  55                  60  
           Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
                   65                  70                  75                  80  
           Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                  90                  95  
           Ala Arg Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
                   100                  105                  110  
           Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                  120

30 <210> 15  
       <211> 448  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial

35 <220>  
       <223> Cadena pesada de eculizumab

# ES 2 936 088 T3

<400> 15

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

# ES 2 936 088 T3

|                                                                 |  |     |  |     |
|-----------------------------------------------------------------|--|-----|--|-----|
| 115                                                             |  | 120 |  | 125 |
| Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr |  |     |  |     |
| 130                                                             |  | 135 |  | 140 |
| Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr |  |     |  |     |
| 145                                                             |  | 150 |  | 155 |
| Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 165 |  | 170 |
|                                                                 |  |     |  | 175 |
| Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 180 |  | 185 |
|                                                                 |  |     |  | 190 |
| Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 195 |  | 200 |
|                                                                 |  |     |  | 205 |
| His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys |  |     |  |     |
| 210                                                             |  | 215 |  | 220 |
| Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser |  |     |  |     |
| 225                                                             |  | 230 |  | 235 |
|                                                                 |  |     |  | 240 |
| Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 245 |  | 250 |
|                                                                 |  |     |  | 255 |
| Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 260 |  | 265 |
|                                                                 |  |     |  | 270 |
| Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala |  |     |  |     |
| 275                                                             |  | 280 |  | 285 |
| Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val |  |     |  |     |
| 290                                                             |  | 295 |  | 300 |
| Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr |  |     |  |     |
| 305                                                             |  | 310 |  | 315 |
|                                                                 |  |     |  | 320 |
| Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 325 |  | 330 |
|                                                                 |  |     |  | 335 |
| Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 340 |  | 345 |
|                                                                 |  |     |  | 350 |
| Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 355 |  | 360 |
|                                                                 |  |     |  | 365 |

# ES 2 936 088 T3

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser  
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
435 440 445

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena ligera de eculizumab

<400> 16

Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn  
1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena ligera de eculizumab

<400> 17

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp  
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de cadena ligera de eculizumab

<400> 18

Gln Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera de eculizumab

<400> 19

# ES 2 936 088 T3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
          20           25           30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
          65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu
          85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 20  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cadena ligera de eculizumab

<400> 20

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
          20           25           30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

```

# ES 2 936 088 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 21  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR1 de cadena pesada de BNJ383  
<400> 21

Asp Tyr Ser Met Asp  
1 5

<210> 22  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR2 de cadena pesada de BNJ383  
<400> 22

Ala Ile His Leu Asn Thr Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 23  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR3 de cadena pesada de BNJ383

5 &lt;400&gt; 23

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Phe | Tyr | Asp | Gly | Tyr | Ser | Pro | Met | Asp | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 120

10 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Región variable de cadena pesada de BNJ383

15 &lt;400&gt; 24

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asp | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Met | Asp | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ala | Ile | His | Leu | Asn | Thr | Gly | Tyr | Thr | Asn | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Thr | Ser | Thr | Val | Tyr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Arg | Gly | Phe | Tyr | Asp | Gly | Tyr | Ser | Pro | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser |
|     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |

&lt;210&gt; 25

20 &lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

25 &lt;223&gt; Cadena pesada de BNJ383

&lt;400&gt; 25

# ES 2 936 088 T3

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

# ES 2 936 088 T3

```

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
 210                215                220

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
225                230                235                240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                250                255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
                260                265                270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
                275                280                285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290                295                300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                310                315                320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                325                330                335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
                340                345                350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
                355                360                365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370                375                380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                390                395                400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                410                415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
                420                425                430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
                435                440                445

```

<210> 26  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> CDR1 de cadena ligera de BNJ383

<400> 26

```

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
 1                5                10                15

```

<210> 27  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> CDR2 de cadena ligera de BNJ383  
 <400> 27  
 Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 1 5  
 10  
 <210> 28  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> CDR3 de cadena ligera de BNJ383  
 <400> 28  
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr  
 1 5  
 20  
 <210> 29  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Región variable de cadena ligera de BNJ383  
 30  
 <400> 29  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn  
 85 90 95  
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110  
 35  
 <210> 30  
 <211> 218  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Cadena ligera de BNJ383  
 <400> 30

# ES 2 936 088 T3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
          20           25           30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
          35           40           45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
          50           55           60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65           70           75           80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
          85           90           95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105          110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
          115          120          125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130          135          140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145          150          155          160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
          165          170          175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
          180          185          190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
          195          200          205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210          215

```

5 <210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> CDR1 de cadena pesada de samalizumab

<400> 31  
 Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Ile Ile Leu  
 1 5

15 <210> 32  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR2 de cadena pesada de samalizumab

&lt;400&gt; 32

His Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Leu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

5

Gly

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

10 &lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR3 de cadena pesada de samalizumab

15

&lt;400&gt; 33

Ser Lys Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

20 &lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Dominio variable de cadena pesada de samalizumab

25

&lt;400&gt; 34

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Ile Ile Leu Trp Val Arg Gln Asn Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly His Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Leu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Gln Ser Thr Thr Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Gly Arg Ser Lys Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 443

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

30

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Cadena pesada de samalizumab

35

# ES 2 936 088 T3

<400> 35

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20          25          30

Ile Ile Leu Trp Val Arg Gln Asn Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35          40          45

Gly His Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Leu Lys Phe
50          55          60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Gln Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95

Gly Arg Ser Lys Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100         105         110

Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115         120         125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130         135         140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145         150         155         160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165         170         175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn
180         185         190

Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195         200         205

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
210         215         220

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225         230         235         240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245         250         255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260         265         270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275         280         285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val

```

# ES 2 936 088 T3

290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu  
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly  
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
435 440

5 <210> 36  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> CDR1 de cadena ligera de samalizumab

<400> 36  
Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser  
1 5 10

15 <210> 37  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> CDR2 de cadena ligera de samalizumab

<400> 37  
Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp  
1 5

25 <210> 38  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> CDR3 de cadena ligera de samalizumab

<400> 38

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr  
1 5

5 <210> 39  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Región variable de cadena ligera de samalizumab

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

15 <210> 40  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Cadena ligera de samalizumab

<400> 40

# ES 2 936 088 T3

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para llevar a cabo la filtración viral, comprendiendo el método:

(a) ajustar el pH de un fluido que comprende un anticuerpo recombinante a entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,7, y añadir un agente estabilizante al fluido en una cantidad suficiente para producir una concentración final de entre alrededor de 0,1 mM y alrededor de 25 mM de agente estabilizante en el fluido; y

(b) hacer pasar el fluido a través de un filtro de virus para producir un filtrado que comprende el anticuerpo recombinante,

en el que:

(i) el agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en arginina, alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, leucina, lisina, histidina, glicina, sacarosa, trehalosa, manitol, y sortibol; y

(ii) el anticuerpo recombinante comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende:

una CDR1 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1;

una CDR2 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2; y

una CDR3 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3; y

una región variable de cadena ligera que comprende

una CDR1 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 6;

una CDR2 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 7; y

una CDR3 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 8.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además, inmediatamente antes de (b):

hacer pasar el fluido a través de un prefiltro.

3. El método de la reivindicación 2, en el que el prefiltro comprende una membrana de poliamida.

4. El método de la reivindicación 2, en el que el prefiltro es un filtro de profundidad, por ejemplo un filtro de profundidad que comprende un medio de filtración poroso que es aniónico y/o hidrófobo.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que el fluido comprende además entre alrededor de 5 mM y alrededor de 300 mM de cloruro de sodio.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el filtro de virus comprende una membrana de polietersulfona.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el filtro de virus comprende una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF).

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el filtro de virus comprende una membrana de celulosa regenerada con cupramonio.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que, antes de (a), el pH del fluido está entre alrededor de 7,4 y alrededor de 7,8.

10. El método de la reivindicación 1-9, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 4.

11. El método de la reivindicación 1-10, en el que el anticuerpo recombinante comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 5.

12. El método de la reivindicación 1-11, en el que el anticuerpo recombinante comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9.

13. El método de la reivindicación 1-12, en el que el anticuerpo recombinante comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 10.

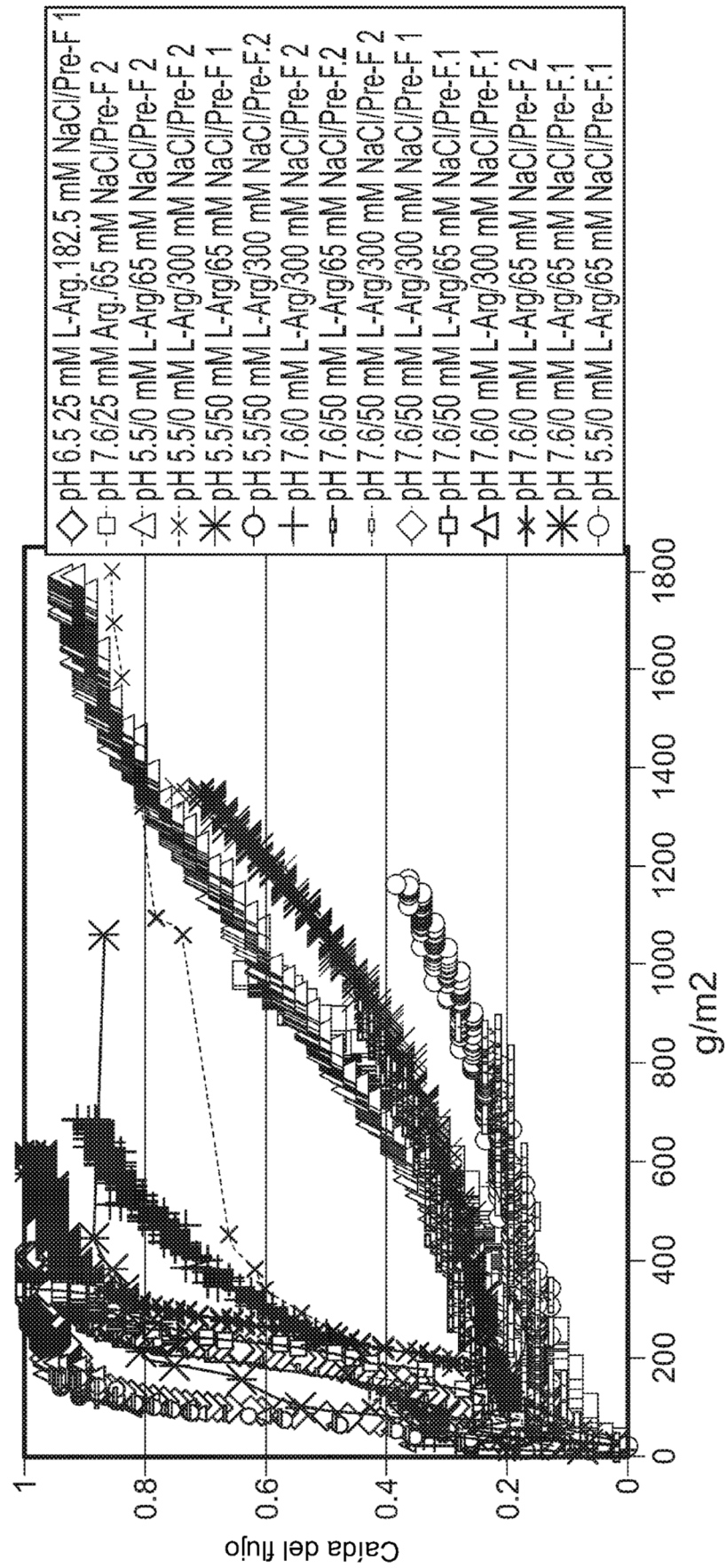


FIG. 1

| Orden del experimento | Prefiltro | pH   | L-Arginina mM | NaCl mM | Concentración de producto (g/l) | Rendimiento a una caída del flujo del 50% (l/m2) | Rendimiento a una caída del flujo del 50% (g/m2) |
|-----------------------|-----------|------|---------------|---------|---------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1                     | 0.1       | 7.6  | 50            | 65      | 3.09                            | 68                                               | 210.12                                           |
| 2                     | 0.1       | 5.5  | 50            | 300     | 2.91                            | 56                                               | 162.96                                           |
| 3                     | 0.1       | 5.5  | 0             | 300     | 3.37                            | 20.8                                             | 70.096                                           |
| 4                     | 0.1       | 5.5  | 0             | 65      | 3.54                            | 18                                               | 63.72                                            |
| 5                     | 0.1       | 7.6  | 0             | 300     | 3.36                            | 9.5                                              | 31.92                                            |
| 6                     | max       | 5.5  | 50            | 65      | 3.06                            | >283                                             | >866                                             |
| 7                     | max       | 5.5  | 0             | 65      | 3.54                            | 229                                              | 810.66                                           |
| 8                     | max       | 5.5  | 0             | 300     | 3.37                            | 300                                              | 1011                                             |
| 9                     | max       | 7.6  | 0             | 65      | 3.53                            | 44.6                                             | 157.438                                          |
| 10                    | 0.1       | 7.6  | 0             | 65      | 3.53                            | 27.2                                             | 96.016                                           |
| 11                    | 0.1       | 5.5  | 50            | 65      | 3.06                            | 79                                               | 241.74                                           |
| 12                    | 0.1       | 6.55 | 25            | 182.5   | 3.27                            | 25                                               | 81.75                                            |
| 13                    | max       | 5.5  | 50            | 300     | 2.91                            | >402                                             | >1172                                            |
| 14                    | max       | 7.6  | 0             | 300     | 3.36                            | 63                                               | 211.68                                           |
| 15                    | max       | 7.6  | 50            | 65      | 3.09                            | >291                                             | >899                                             |
| 16                    | max       | 7.6  | 50            | 300     | 2.92                            | >298                                             | >870                                             |
| 17                    | 0.1       | 7.6  | 50            | 300     | 2.92                            | 64                                               | 186.88                                           |
| 21                    | max       | 7.6  | 25            | 65      | 3.34                            | 254                                              | 848.36                                           |

FIG. 2

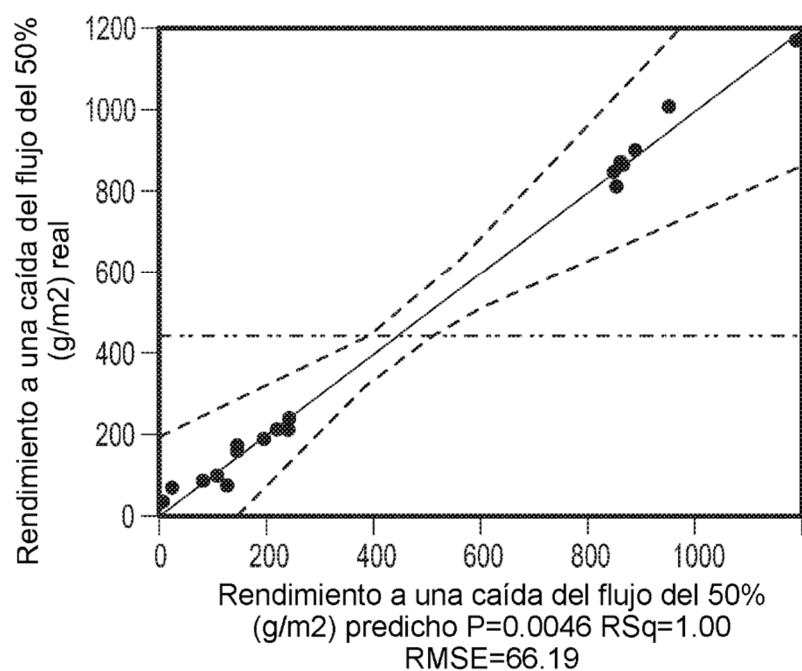


FIG. 3

| Estimaciones de parámetros ordenados               |         |
|----------------------------------------------------|---------|
| Término                                            | Prob> t |
| Prefiltro[0.1]                                     | 0.0003* |
| Prefiltro[0.1]*(Radio hidrodinámico - 5.91667)     | 0.0064* |
| (pH-6.60833)*(Estabilizante-25)                    | 0.0086* |
| Radio hidrodinámico                                | 0.0089* |
| (Estabilizante-25)*(Radio hidrodinámico - 5.91667) | 0.0092* |
| pH                                                 | 0.0094* |
| (mM NaCl-175.972)*(% de Agregados-0.73333)         | 0.0099* |
| mM NaCl                                            | 0.0103* |
| Prefiltro[0.1]*(Estabilizante-25)                  | 0.0161* |
| % de Agregados                                     | 0.0199* |
| (Estabilizante-25)*(% de Agregados-0.73333)        | 0.0472* |
| Prefiltro[0.1]*(% de Agregados-0.73333)            | 0.0515  |
| (pH-6.60833)*(Radio hidrodinámico - 5.91667)       | 0.2303  |
| Estabilizante                                      | 0.2629  |

FIG. 4

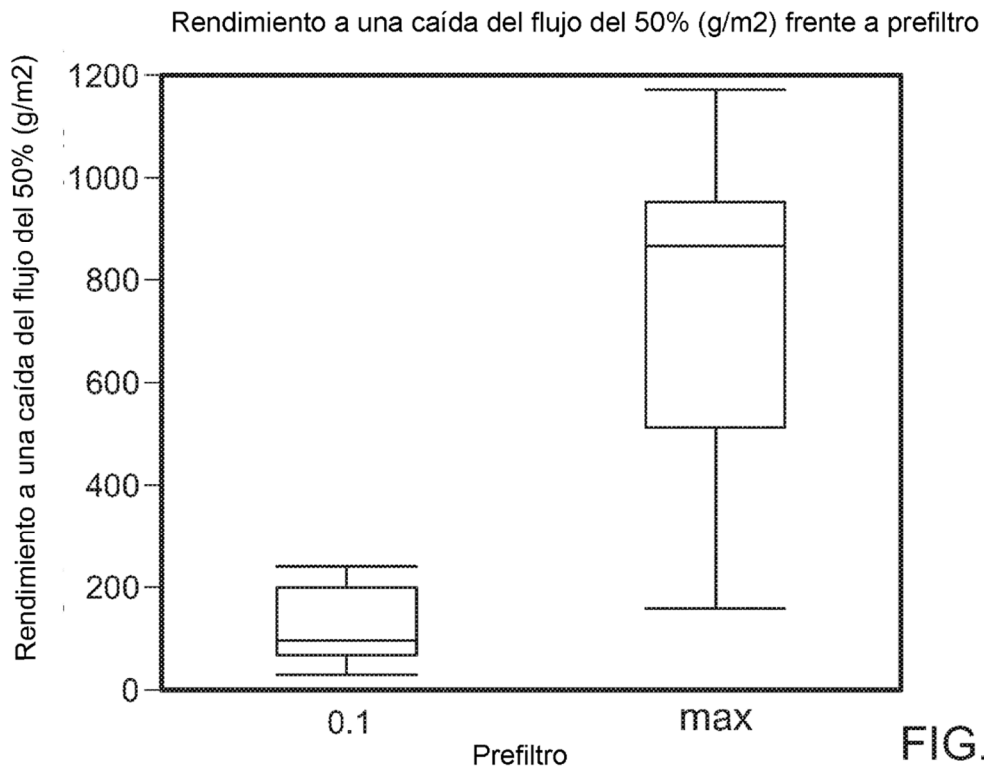


FIG. 5

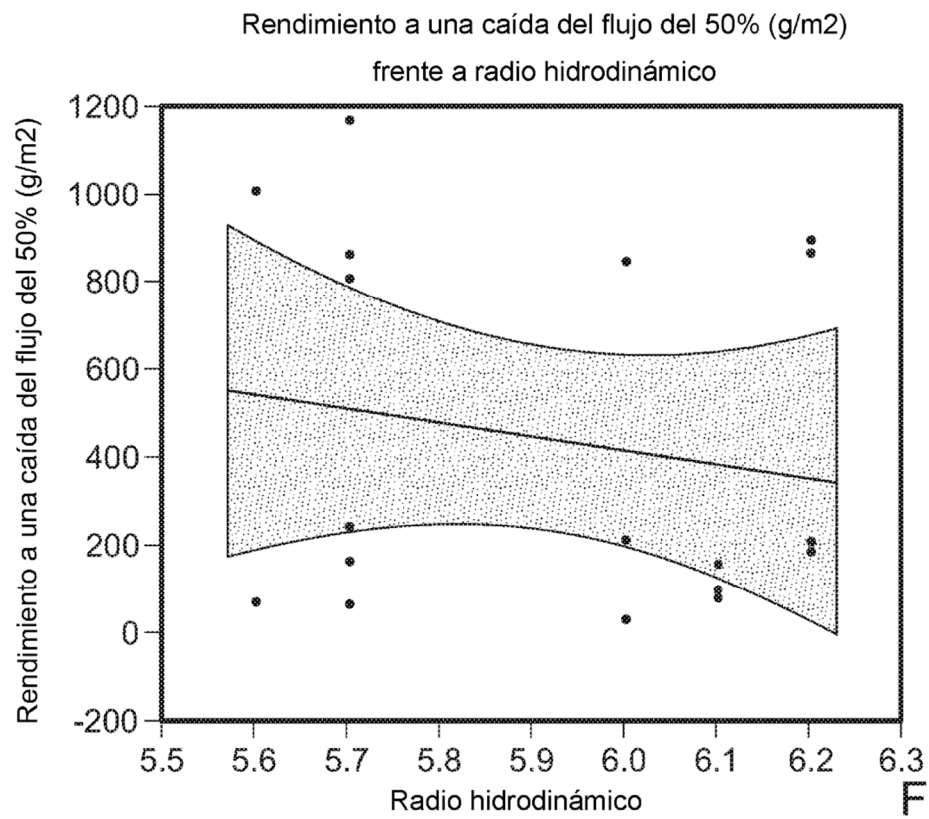


FIG. 6

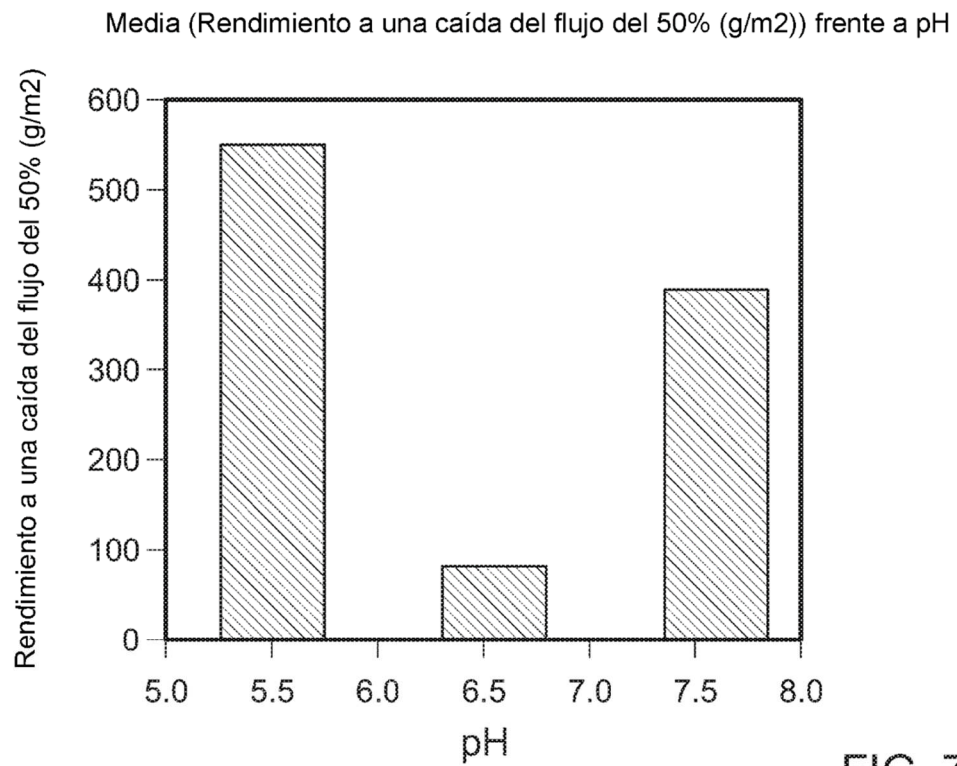


FIG. 7

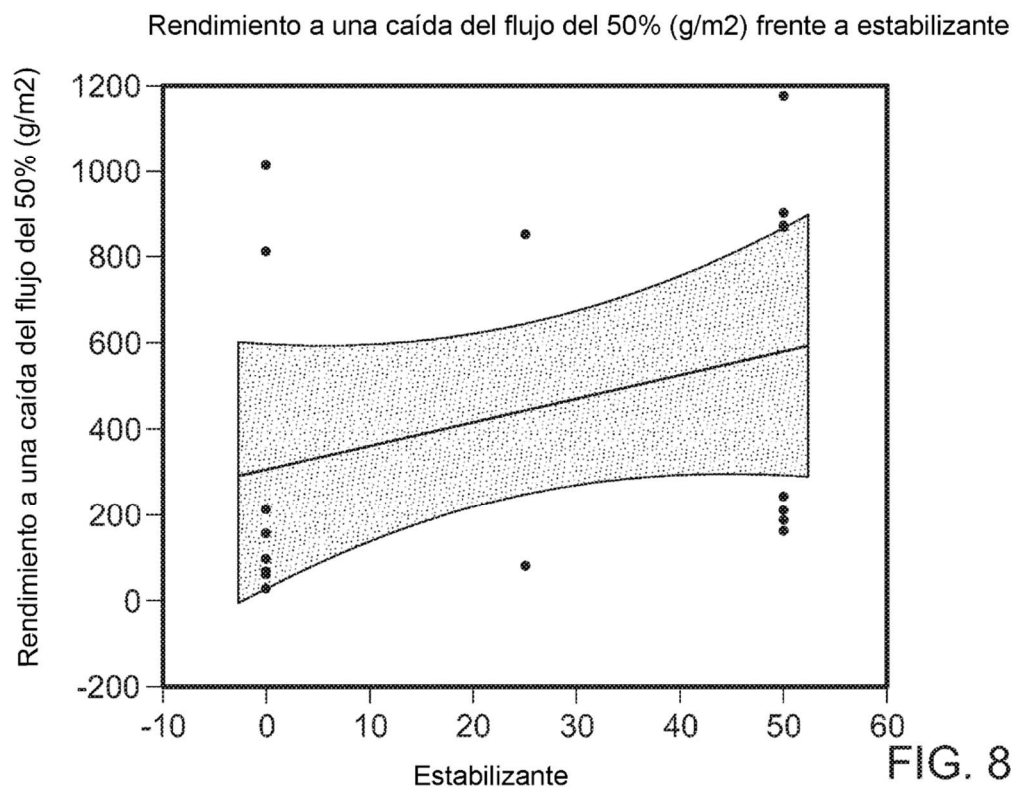
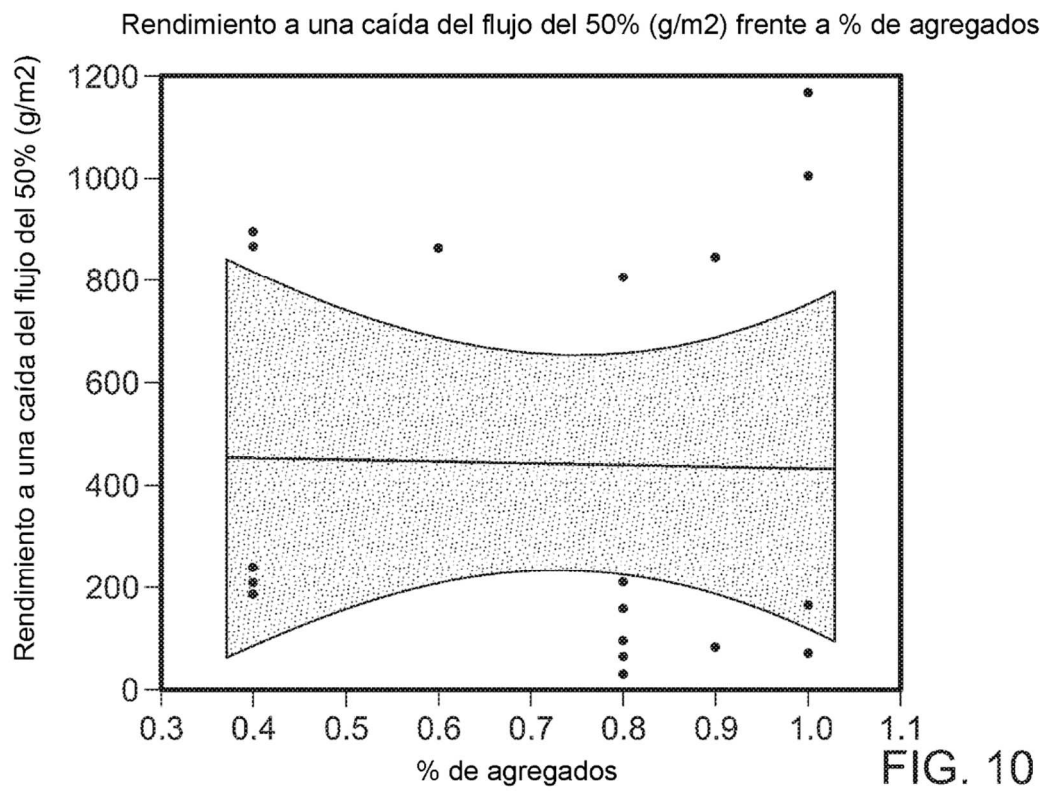
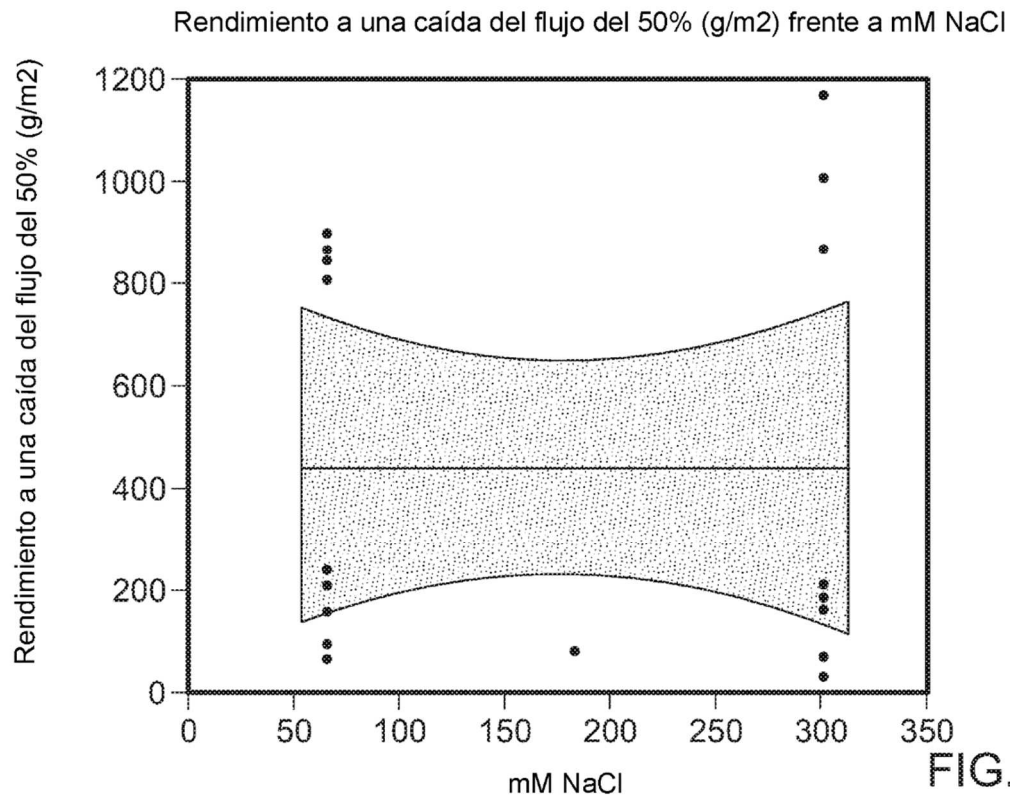


FIG. 8



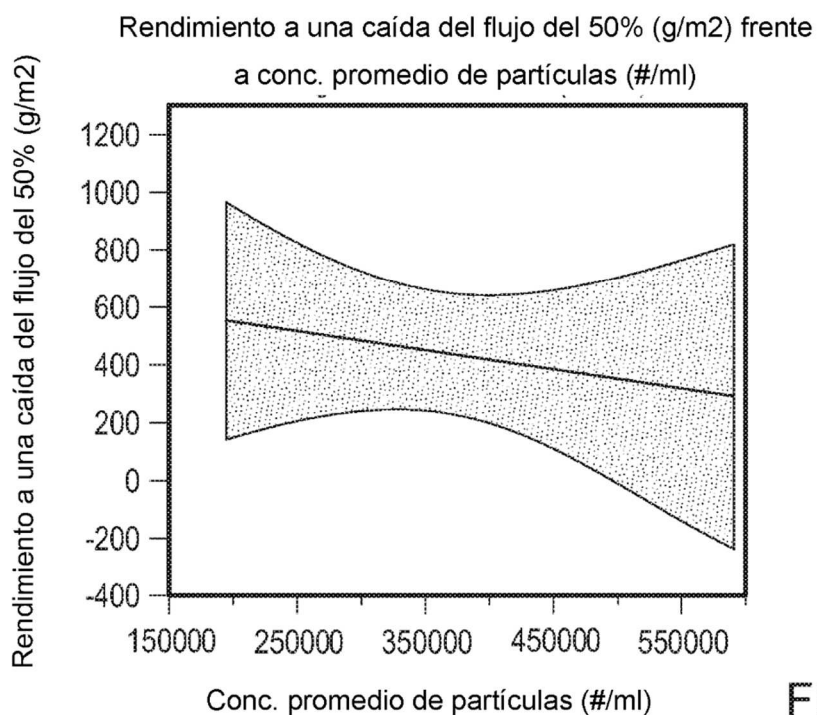


FIG. 11

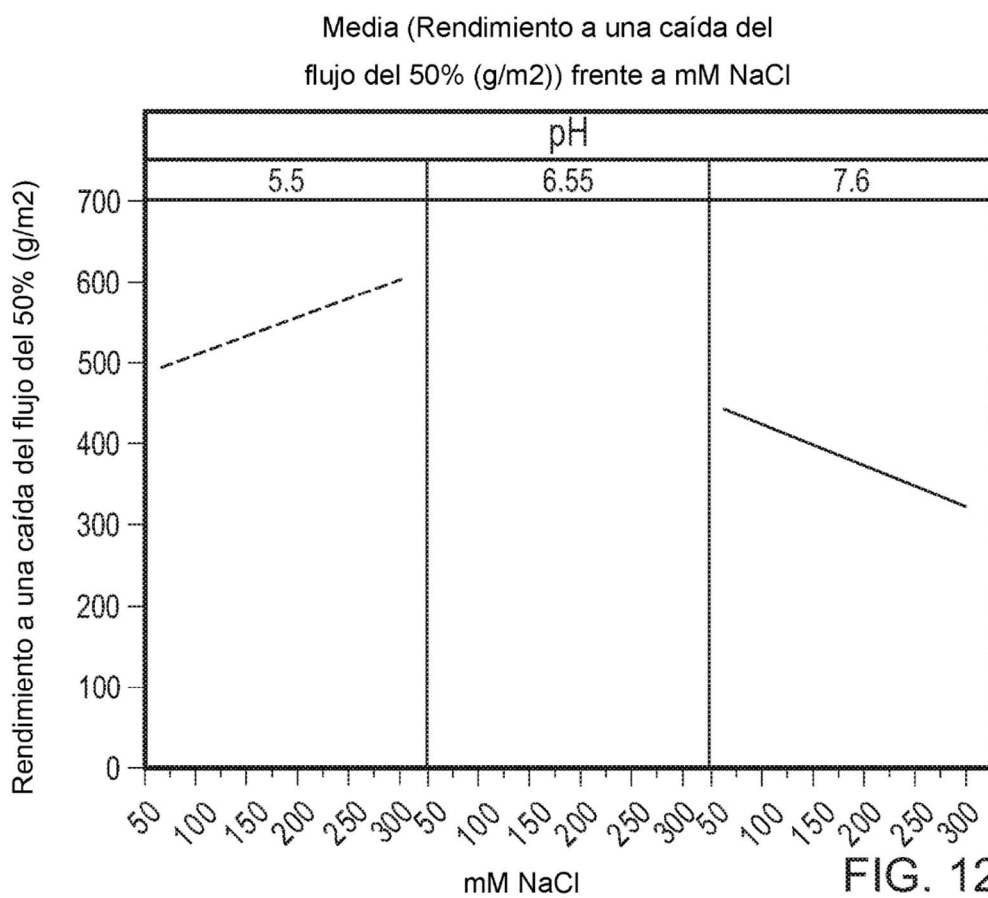
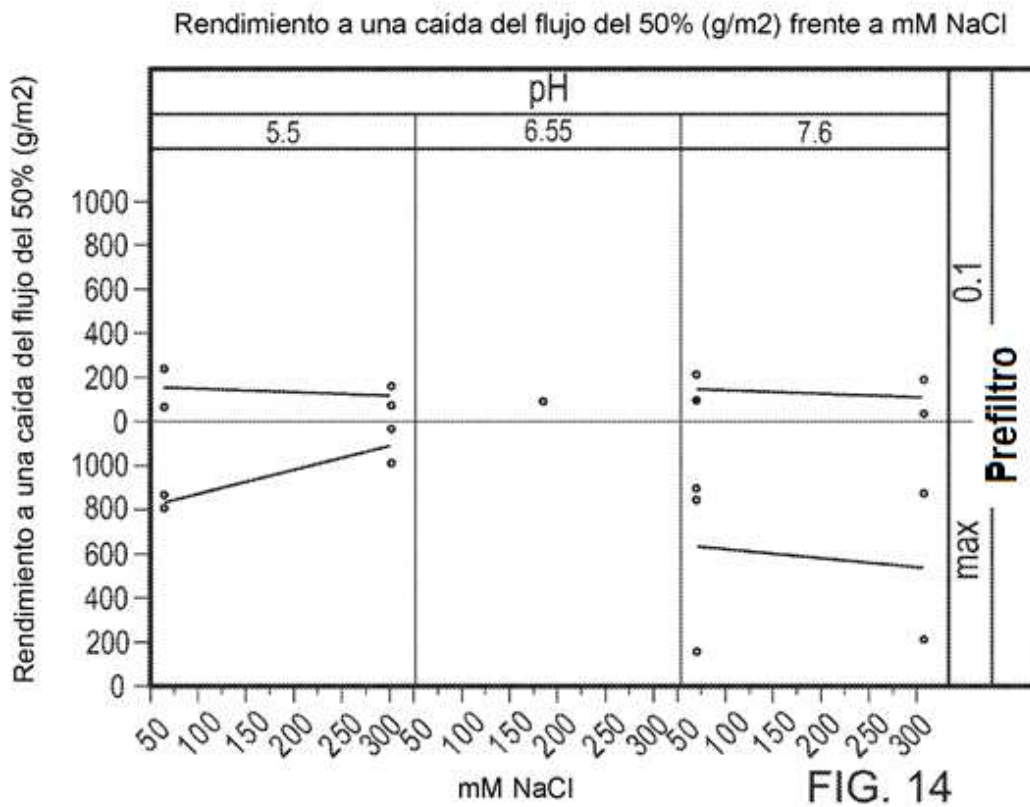
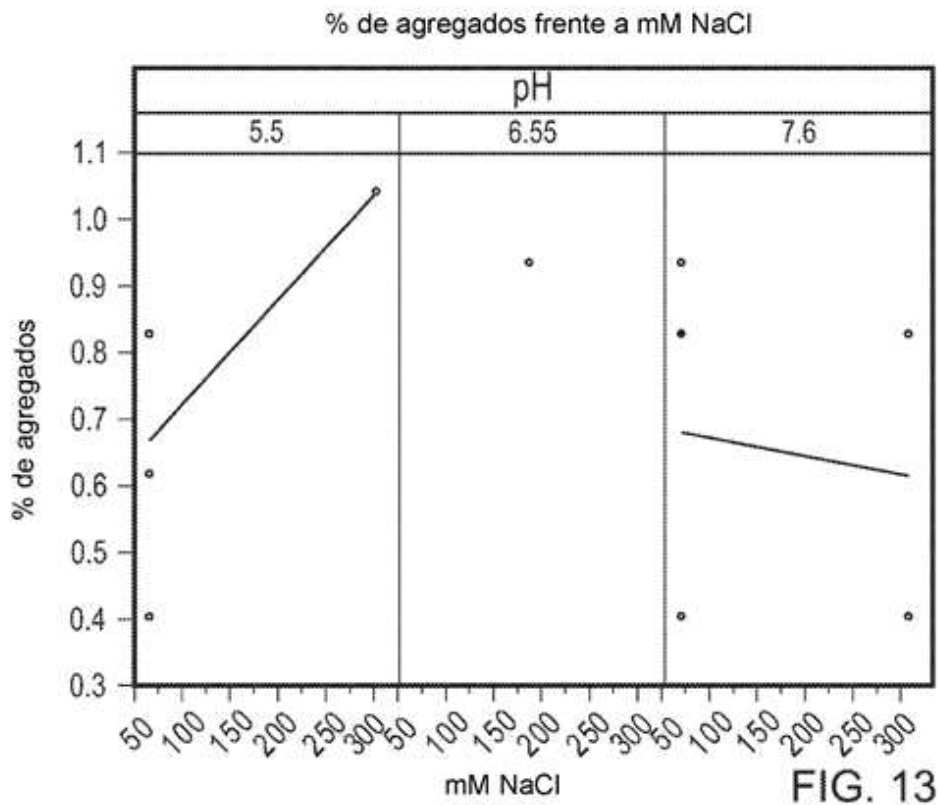


FIG. 12



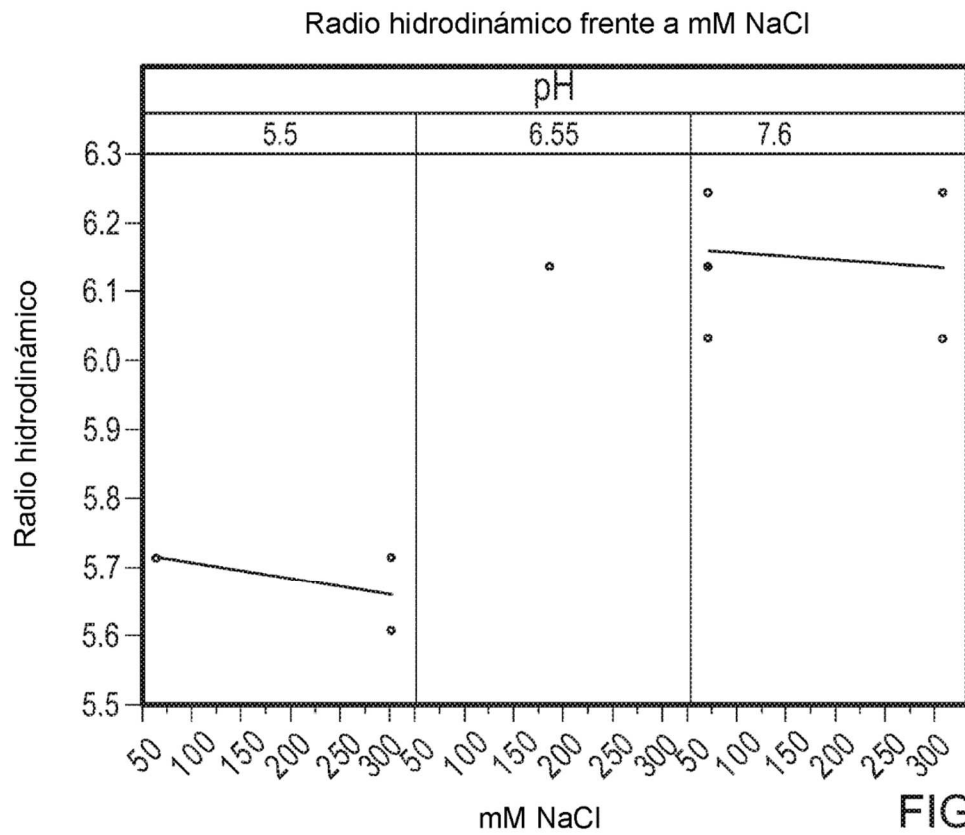


FIG. 15

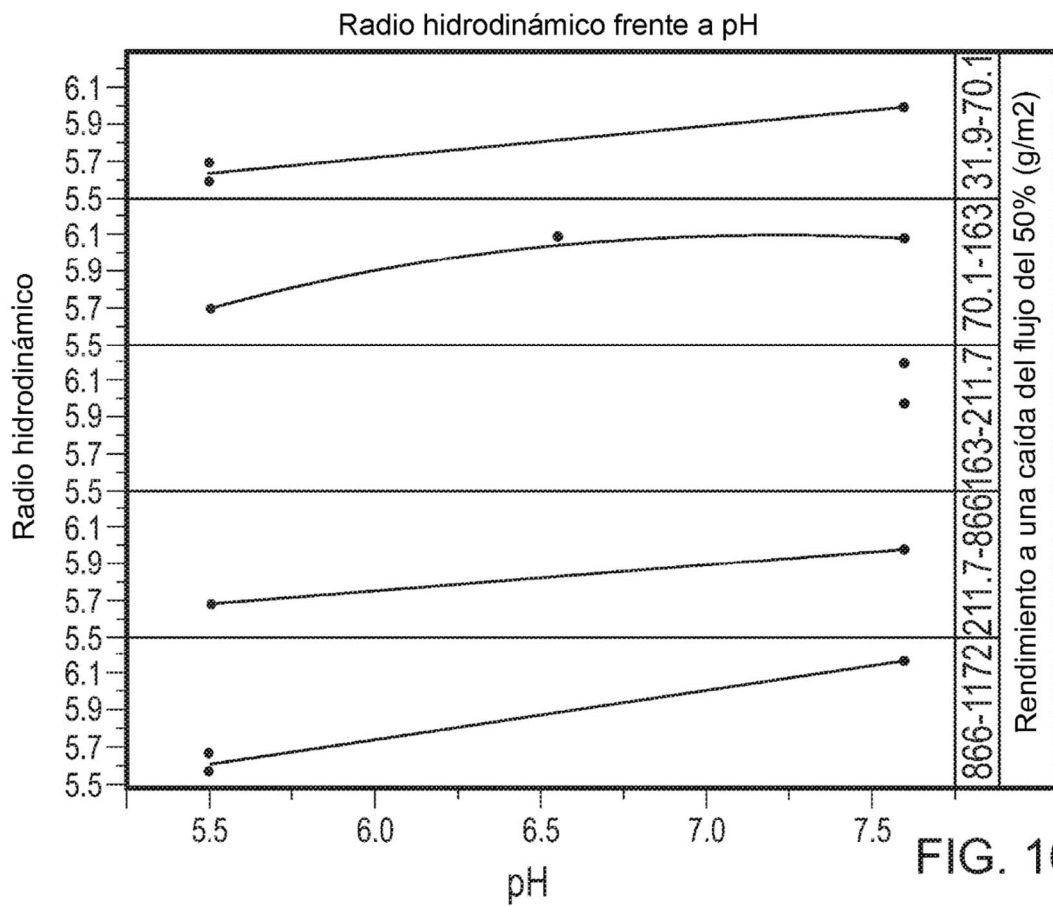


FIG. 16

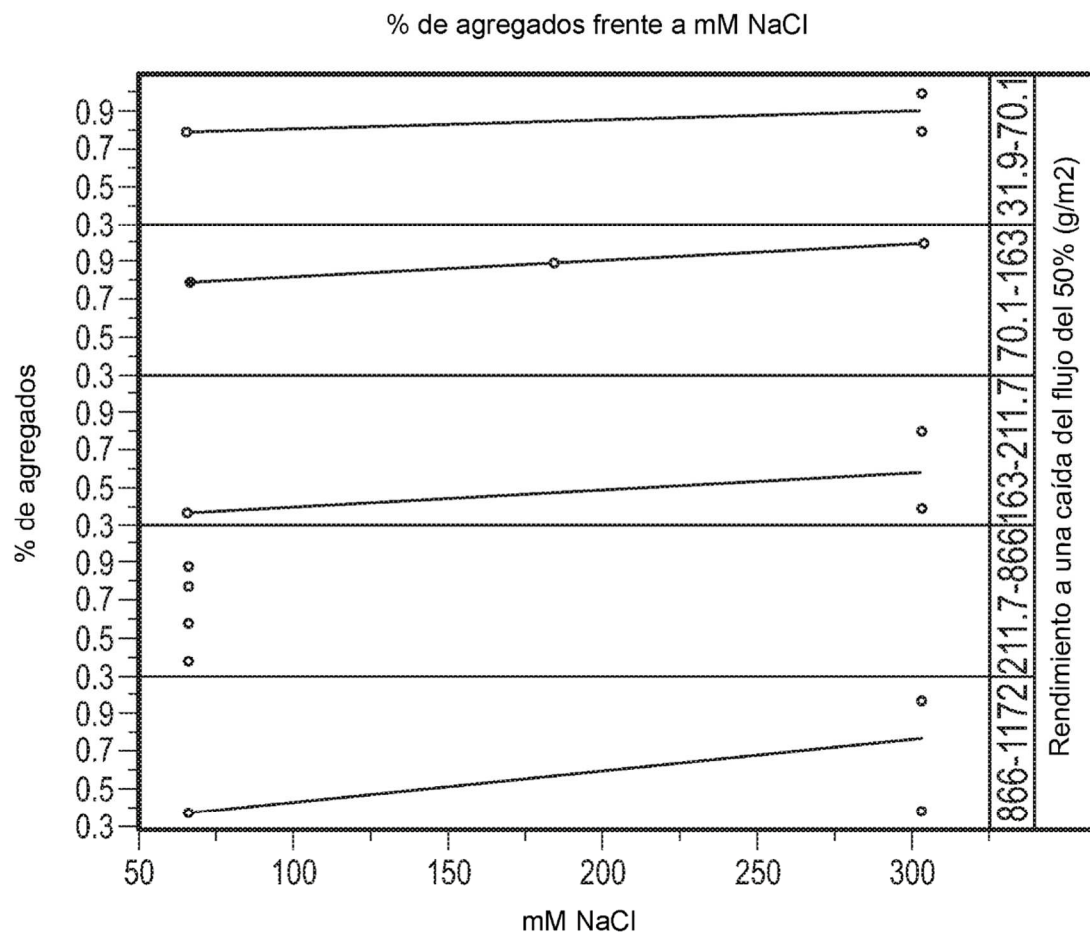


FIG. 17

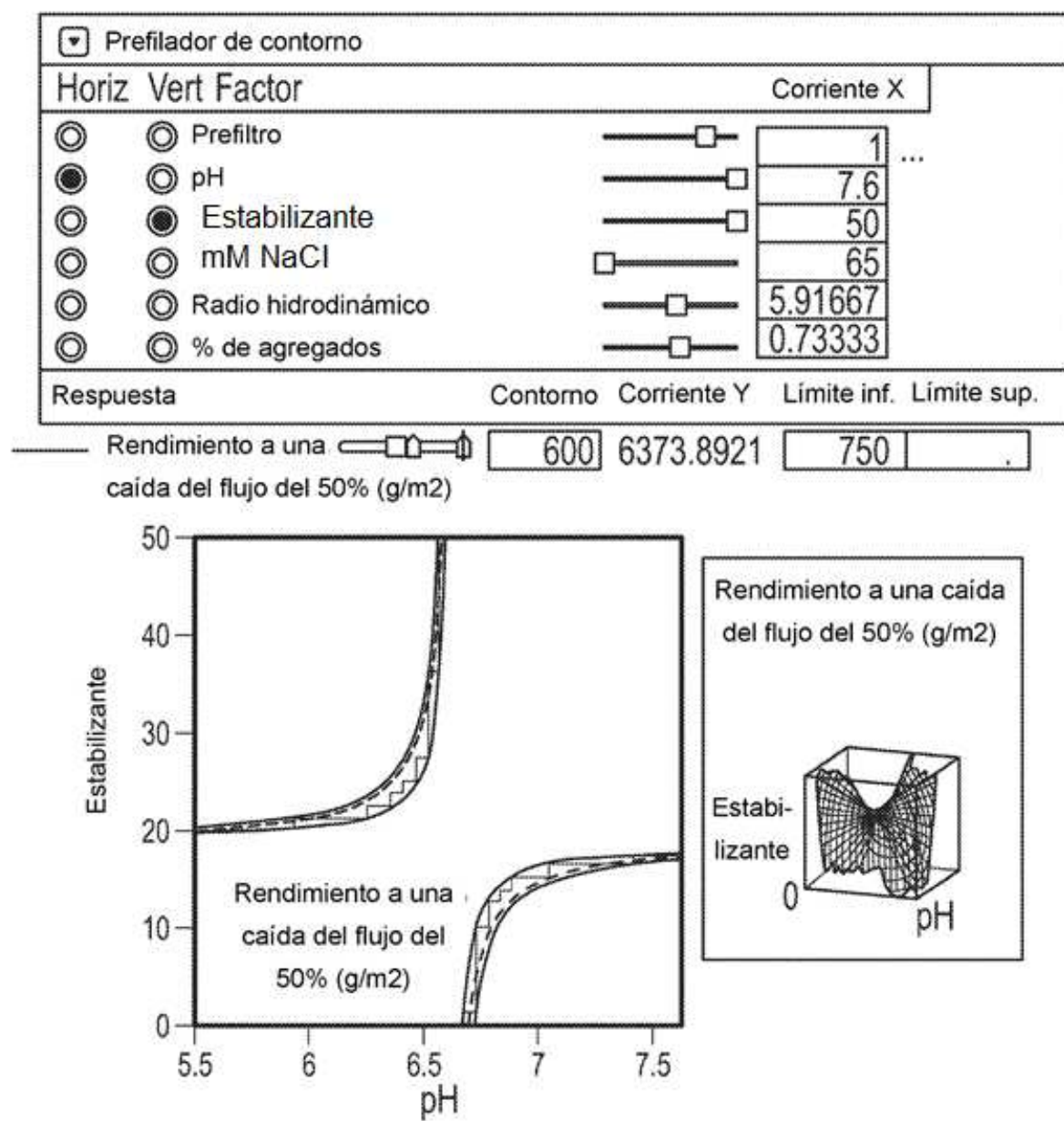


FIG. 18

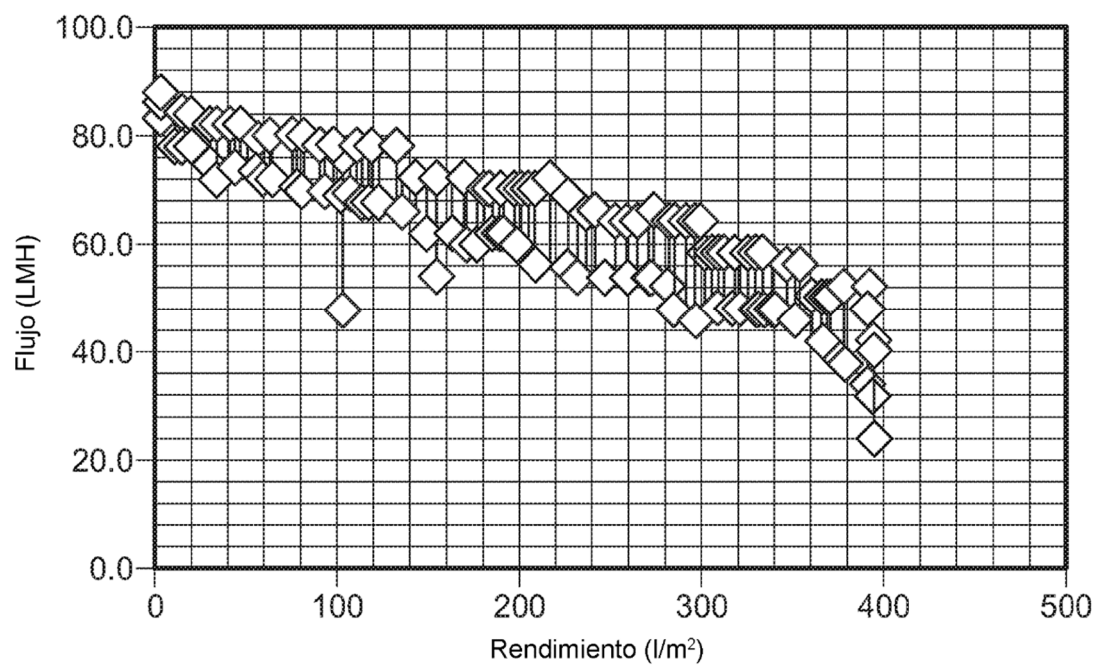


FIG. 19

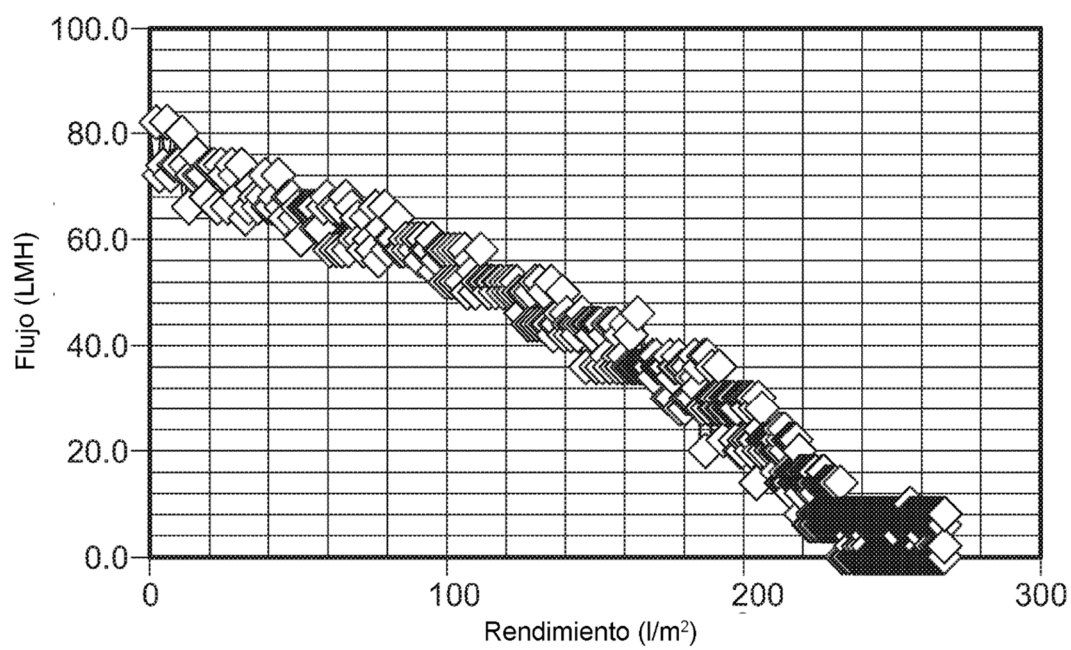


FIG. 20

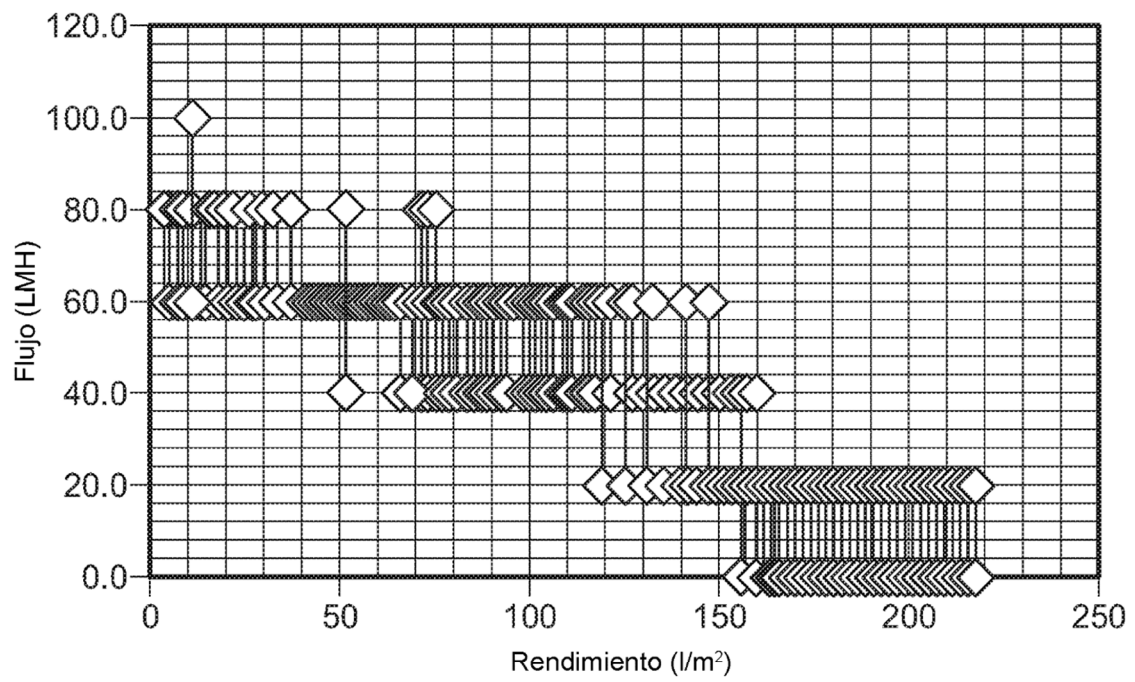


FIG. 21

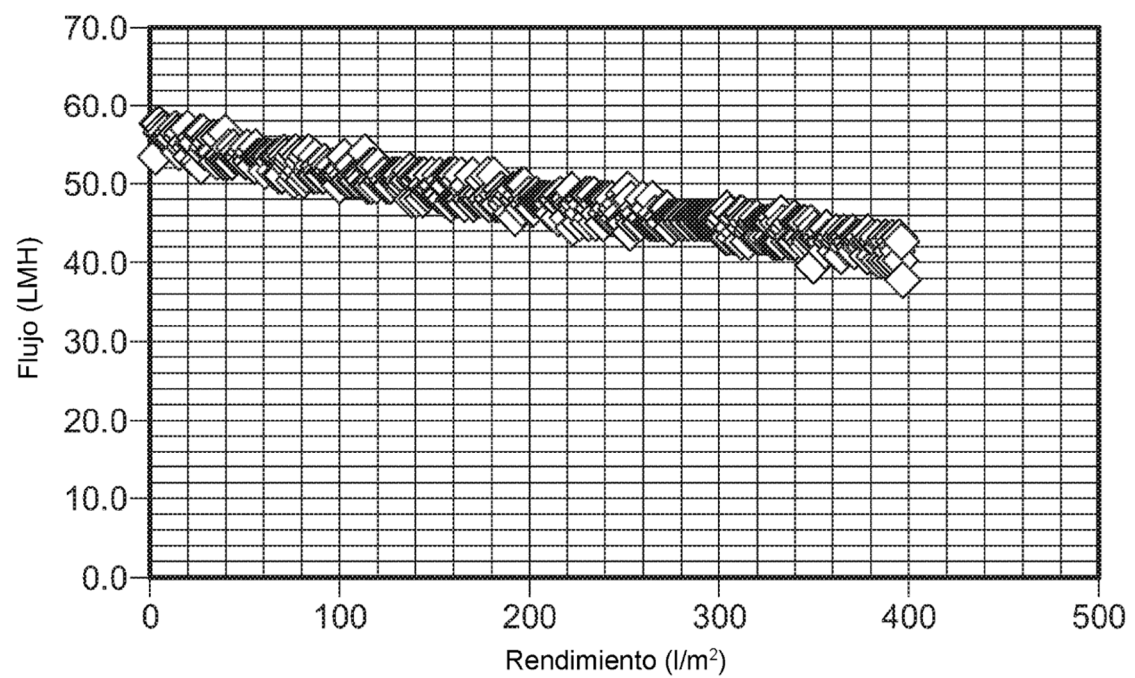


FIG. 22

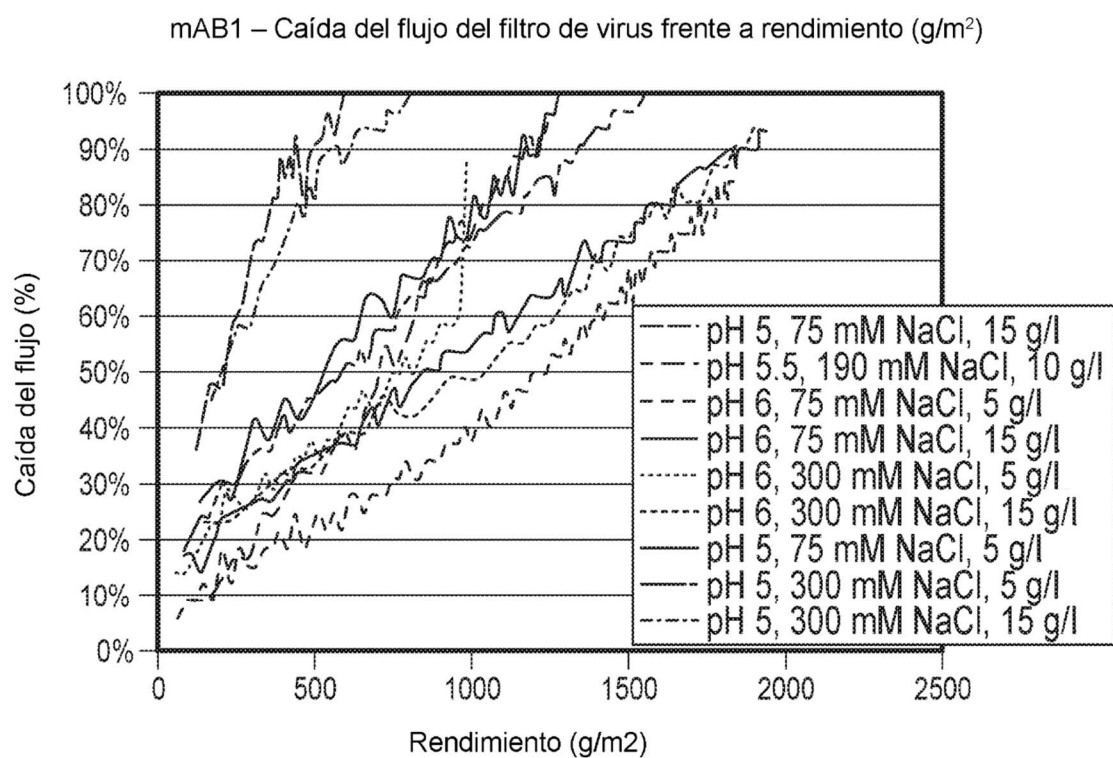


FIG. 23

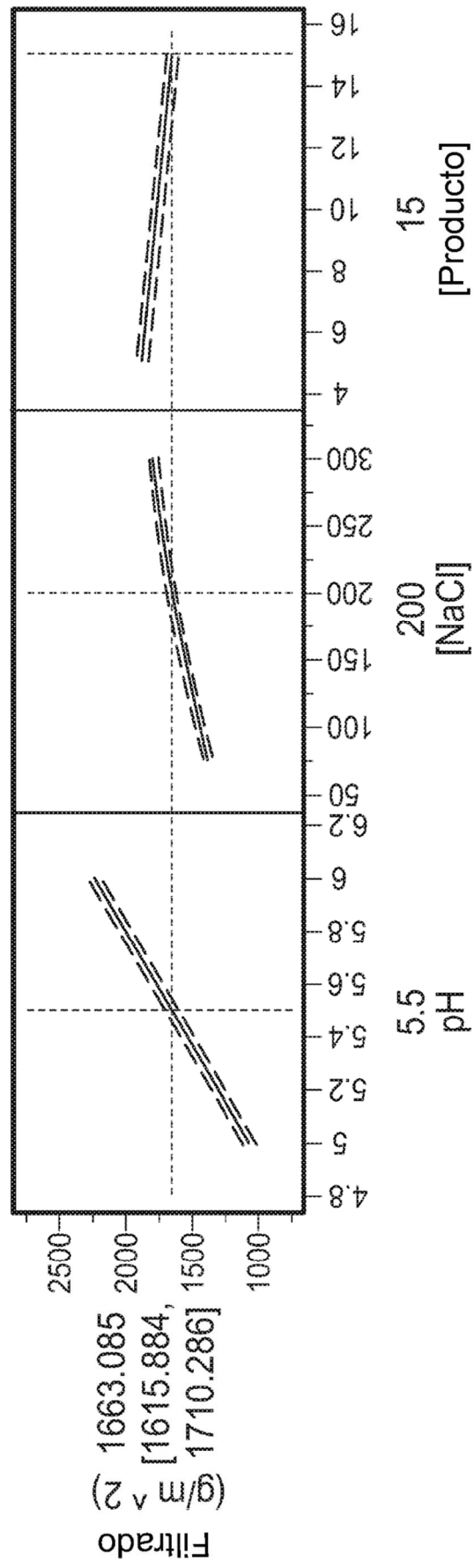


FIG. 24

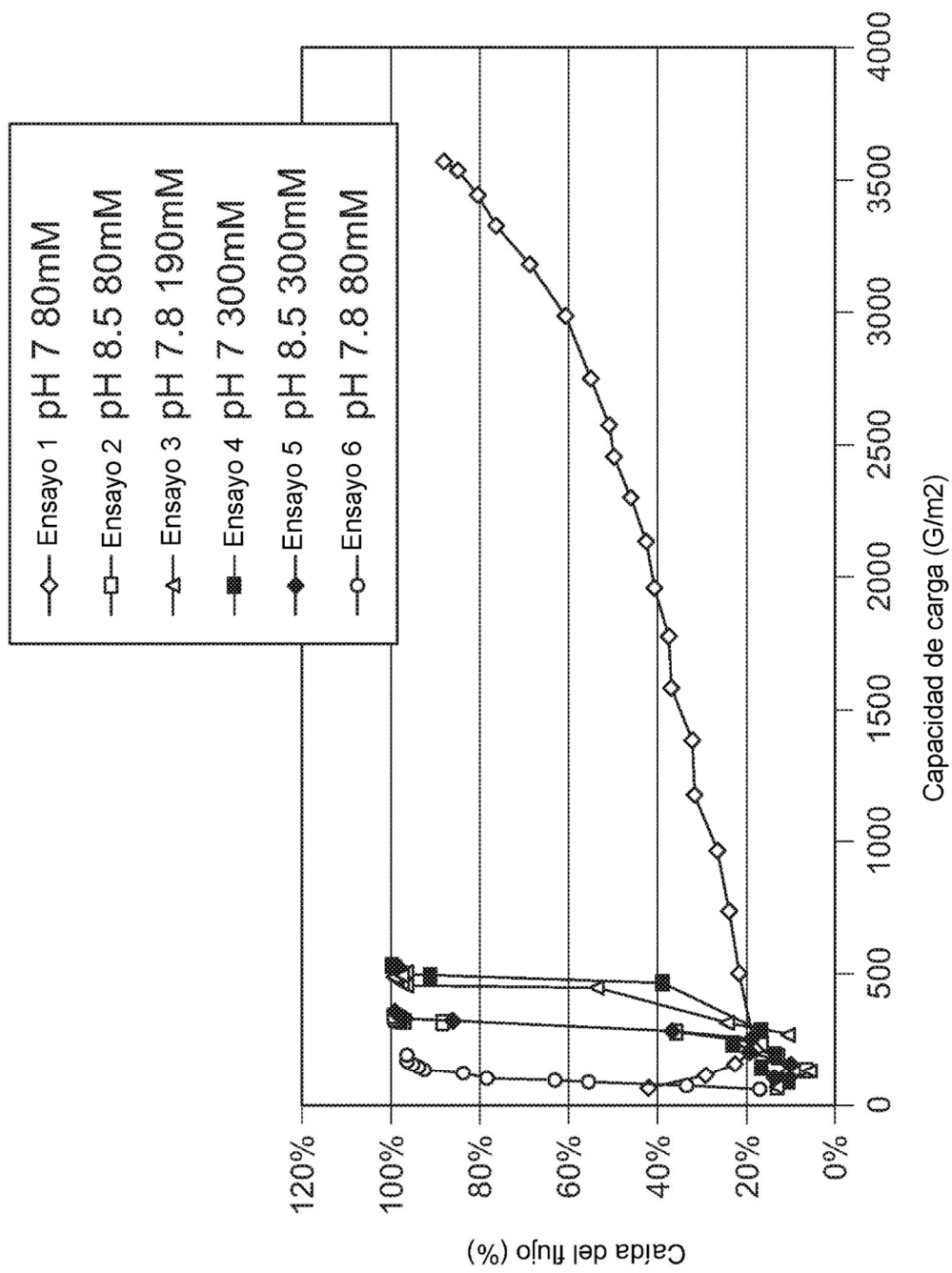
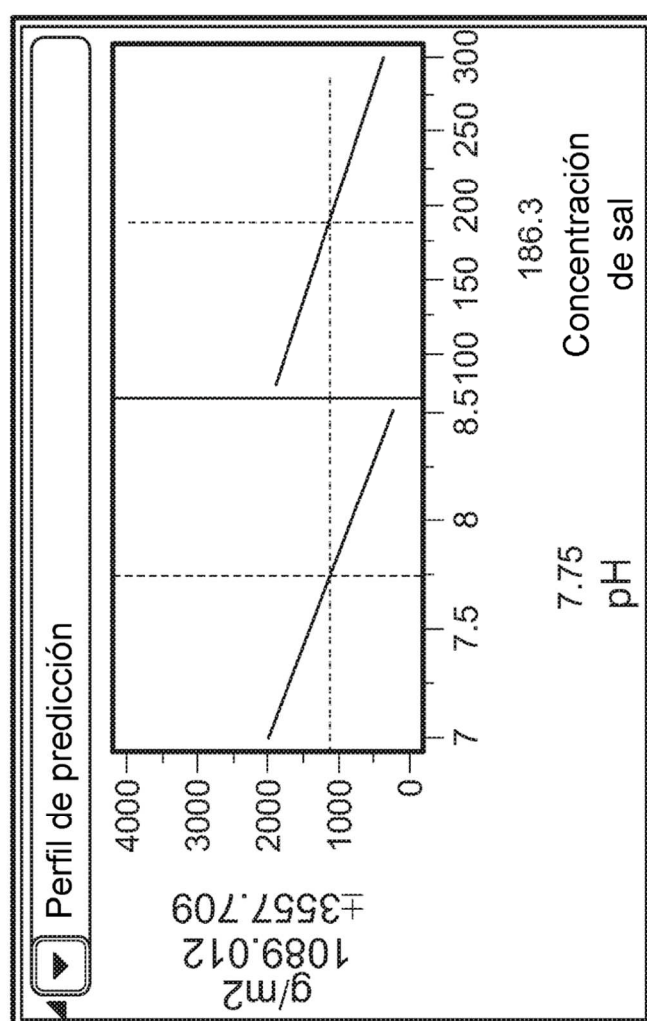


FIG. 25



▼ Estimaciones de parámetros

| Término                      | Estimación | Error std. | Relación t | Prob> t |
|------------------------------|------------|------------|------------|---------|
| Intersección                 | 1063.6     | 279.8      | 3.80       | 0.1638  |
| pH(7,8.5)                    | -847.5     | 312.8259   | -2.71      | 0.2251  |
| Concentración de sal(80,300) | -755.5     | 312.8259   | -2.42      | 0.2499  |
| pH* Concentración de sal     | 758.5      | 312.8259   | 2.42       | 0.2490  |

FIG. 26

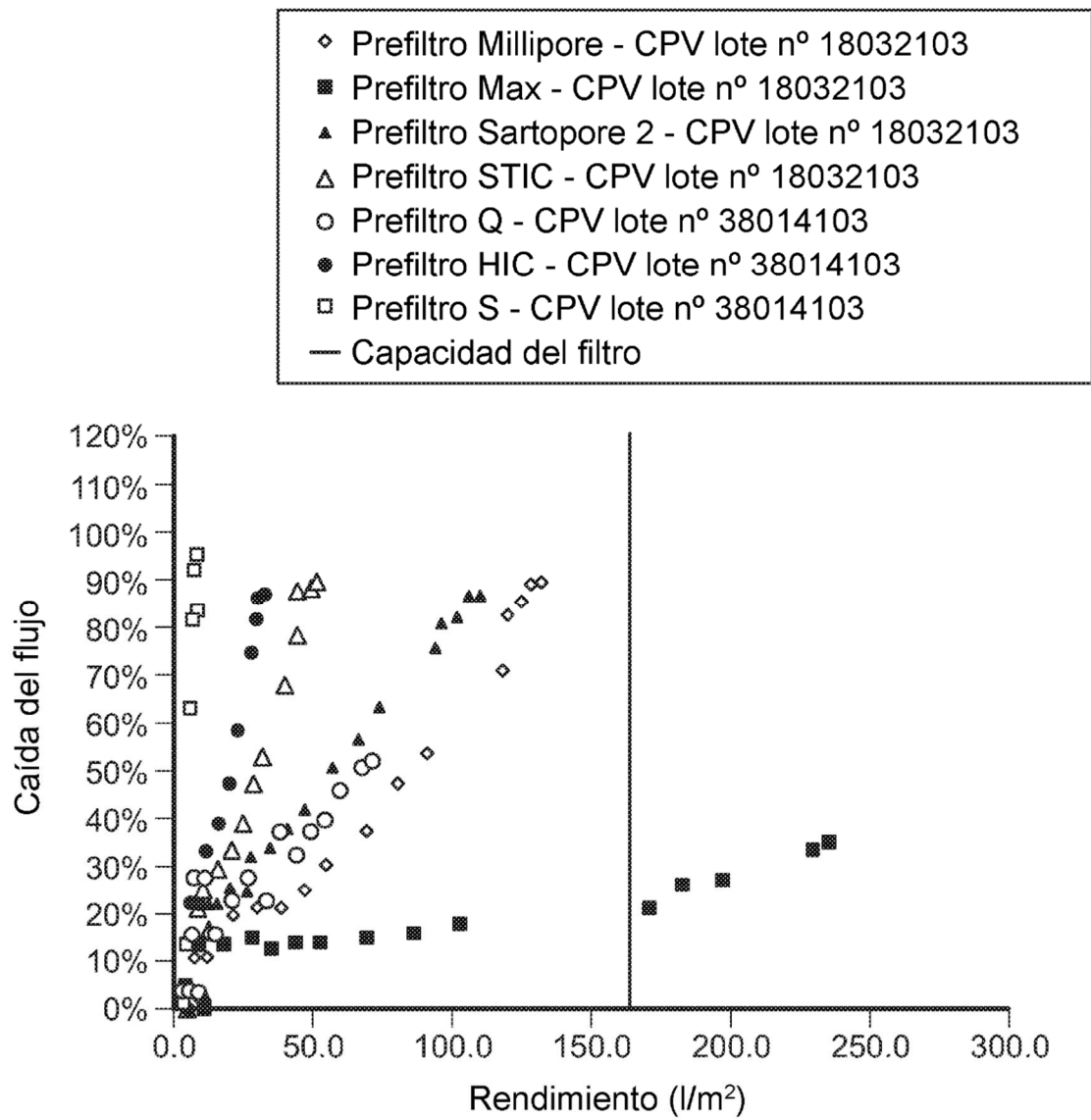


FIG. 27

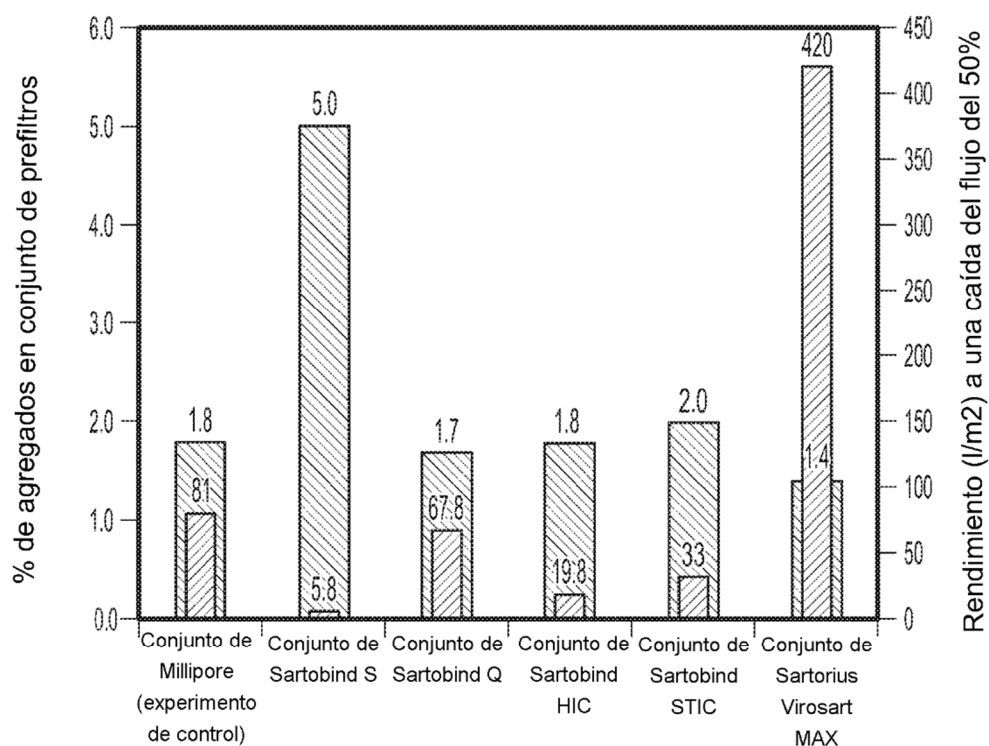


FIG. 28

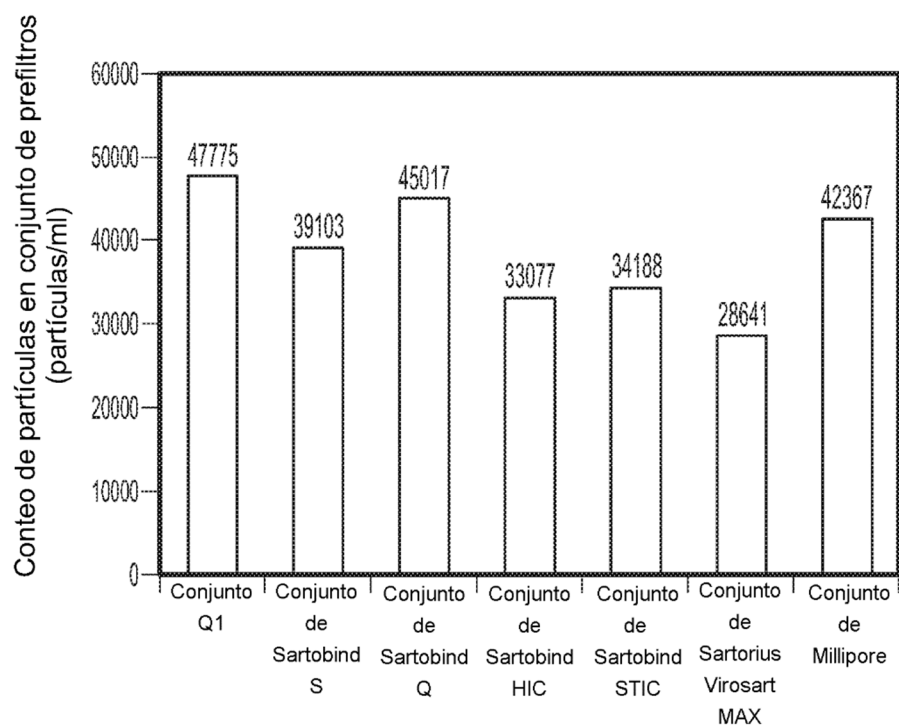


FIG. 29

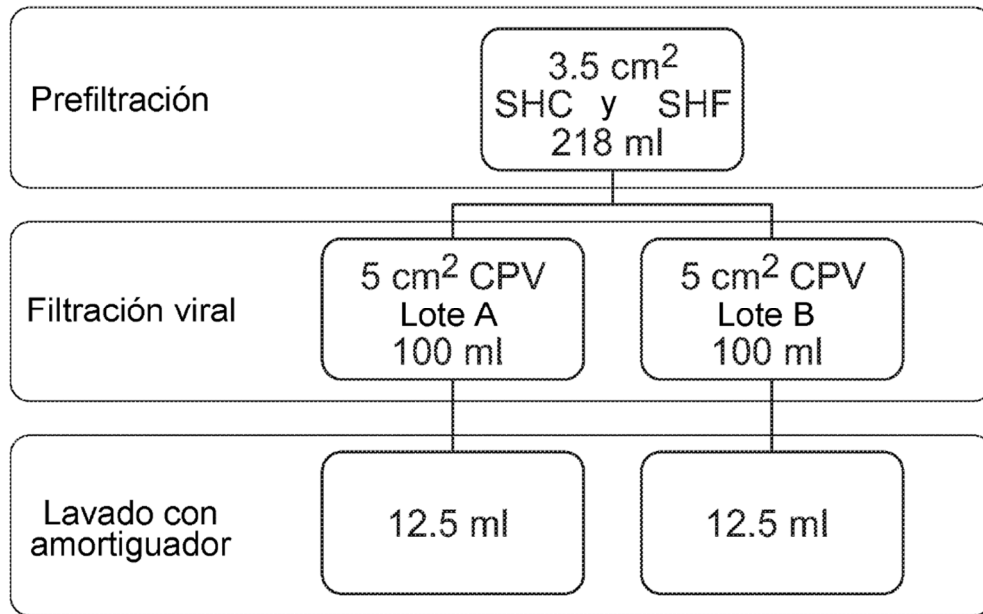


FIG. 30

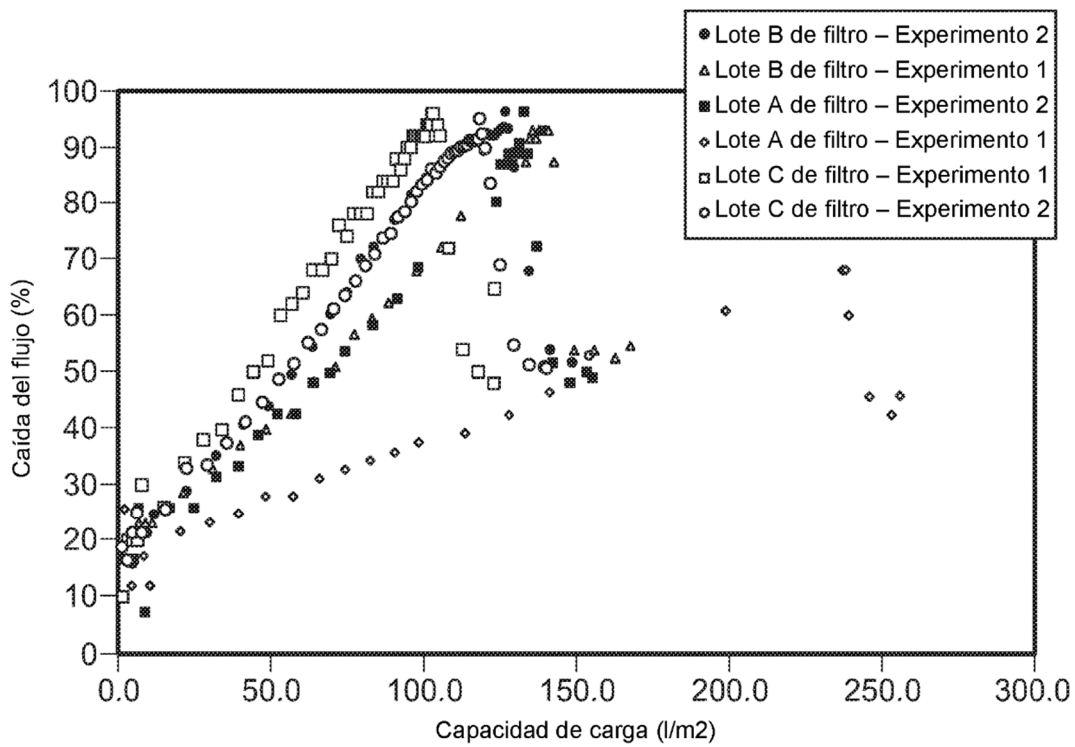


FIG. 31

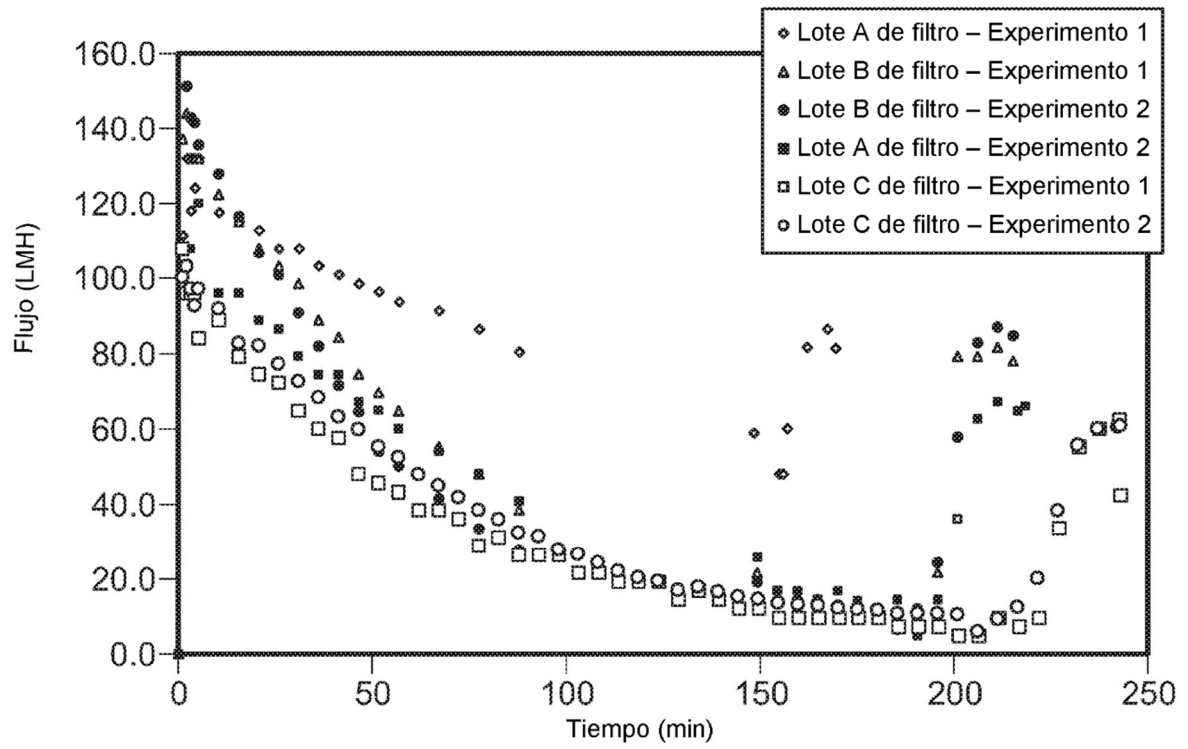


FIG. 32

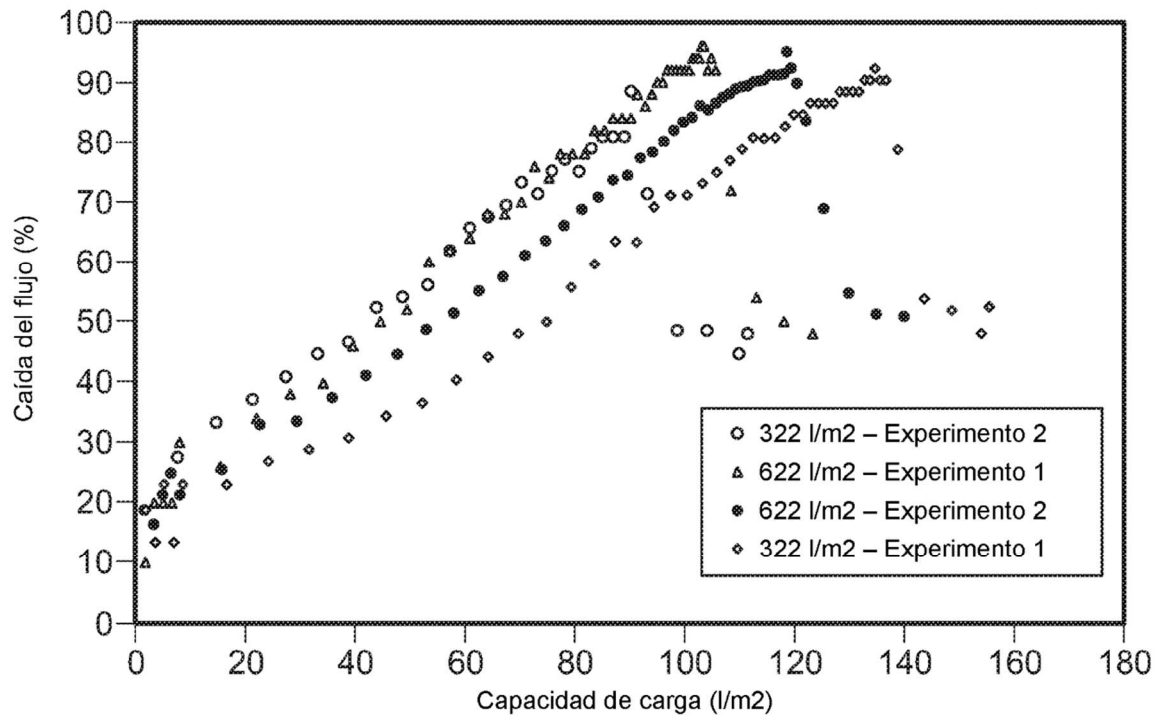


FIG. 33

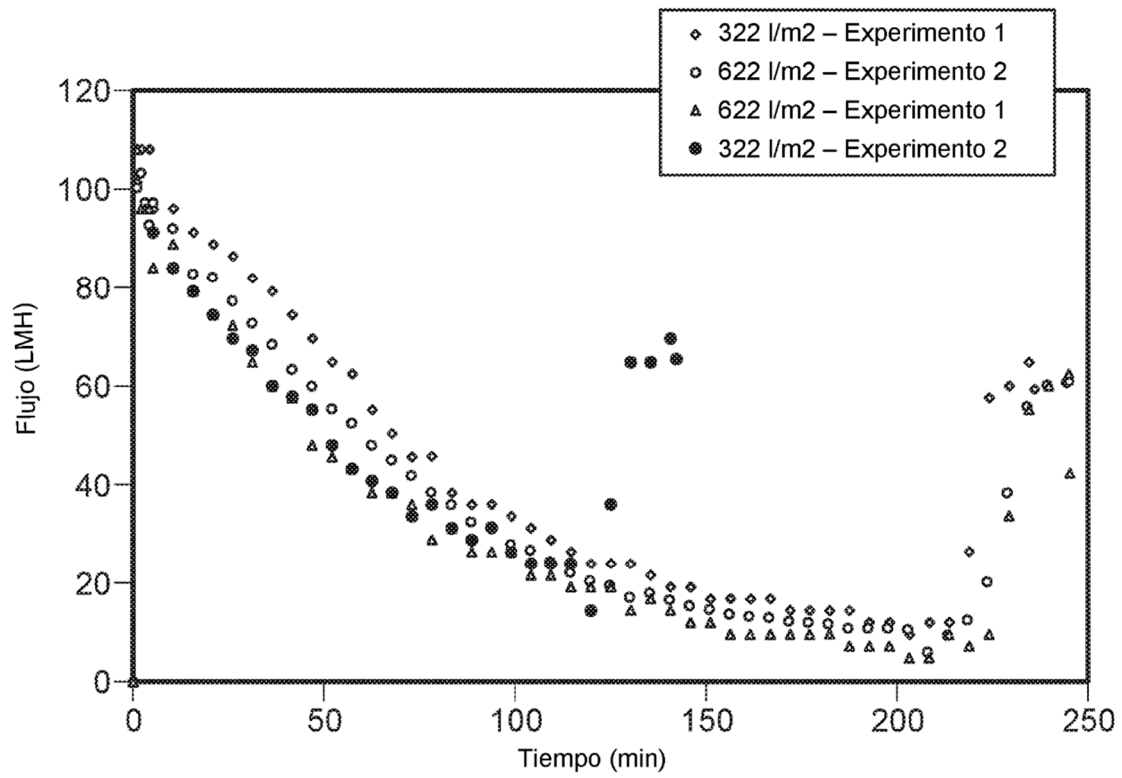


FIG. 34

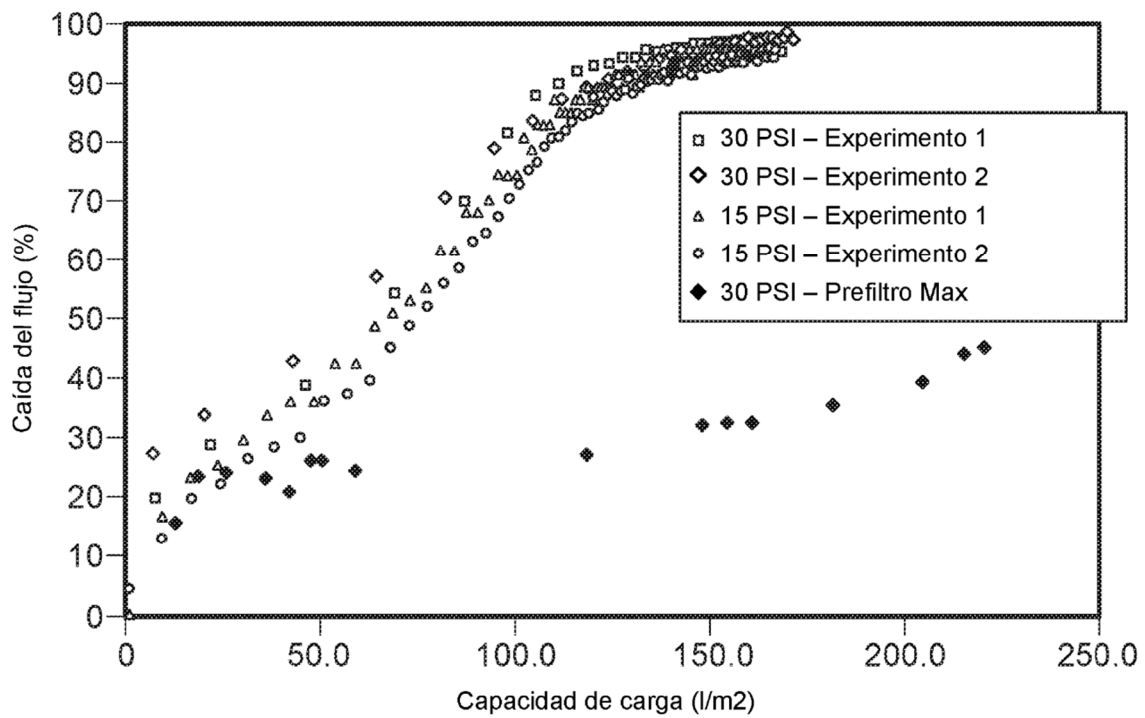


FIG. 35

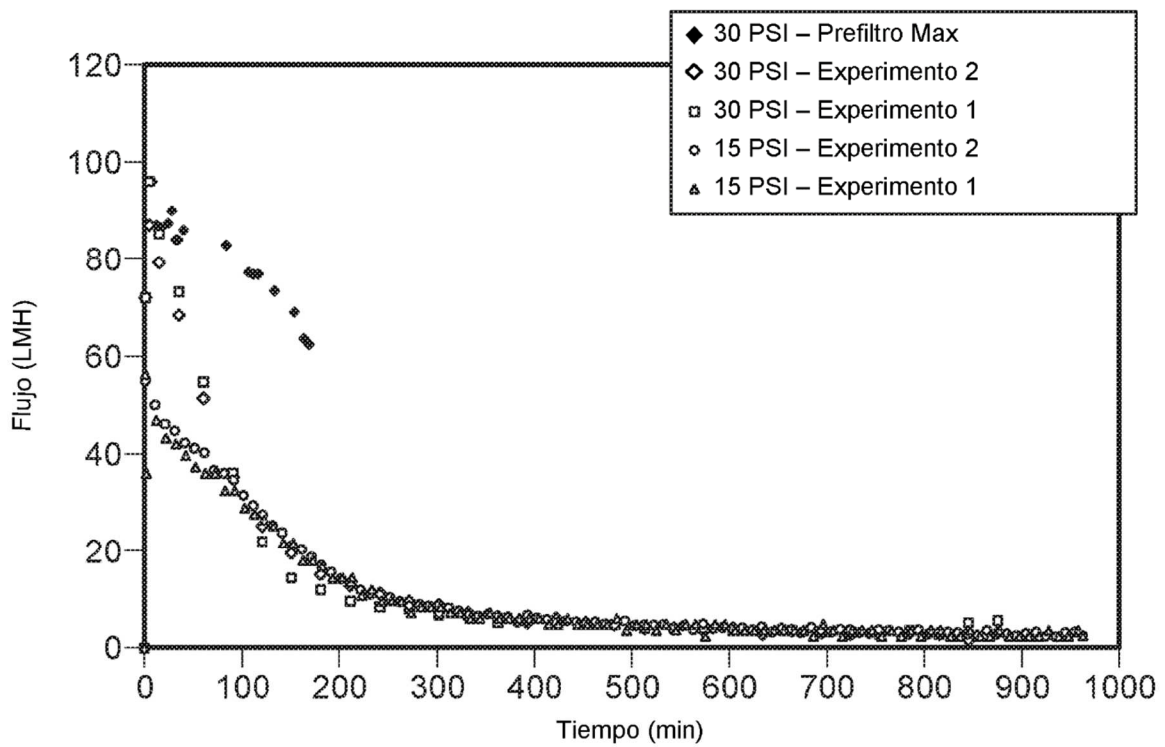


FIG. 36

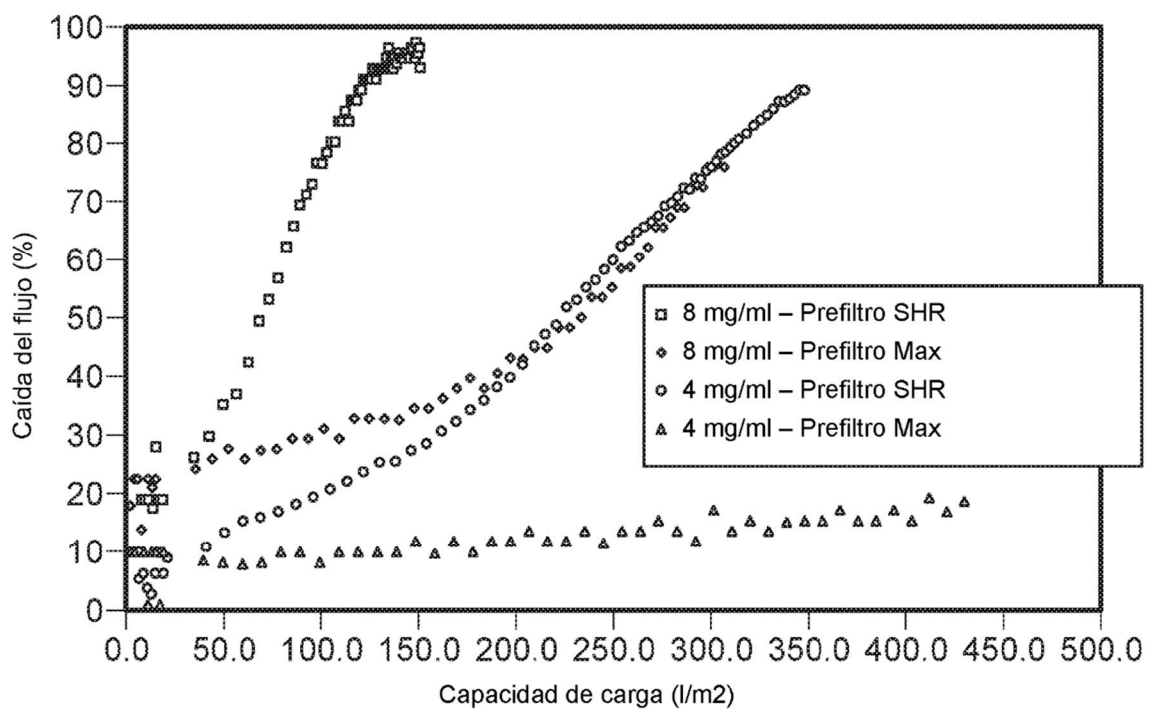


FIG. 37

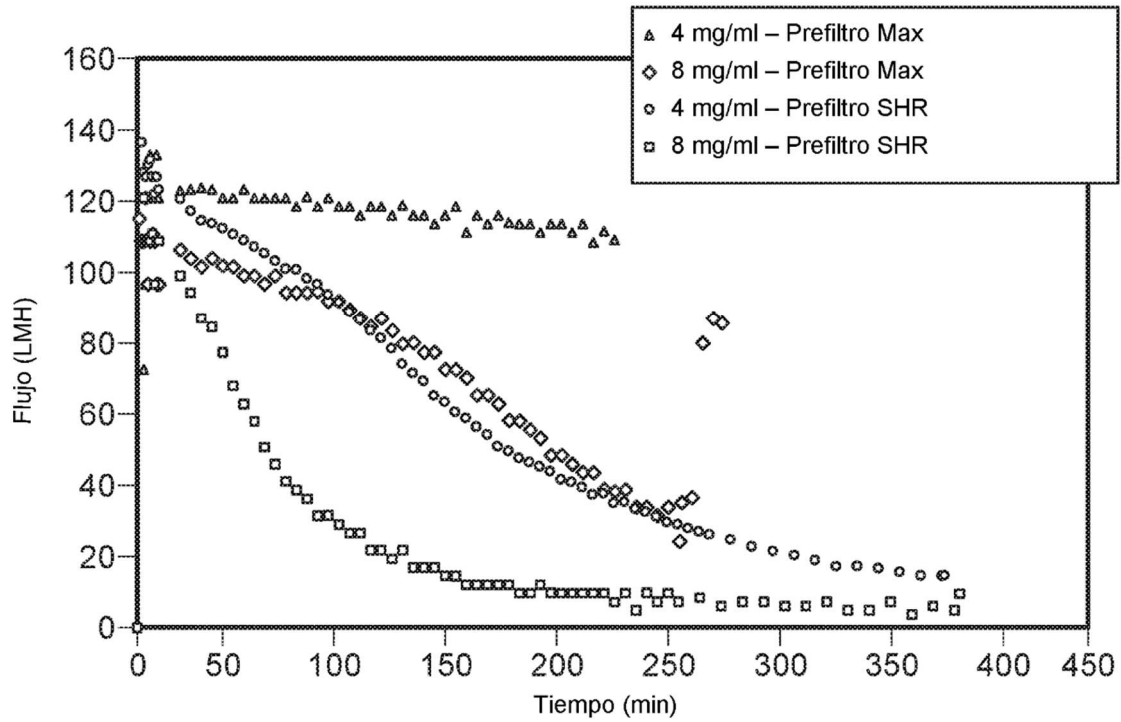


FIG. 38

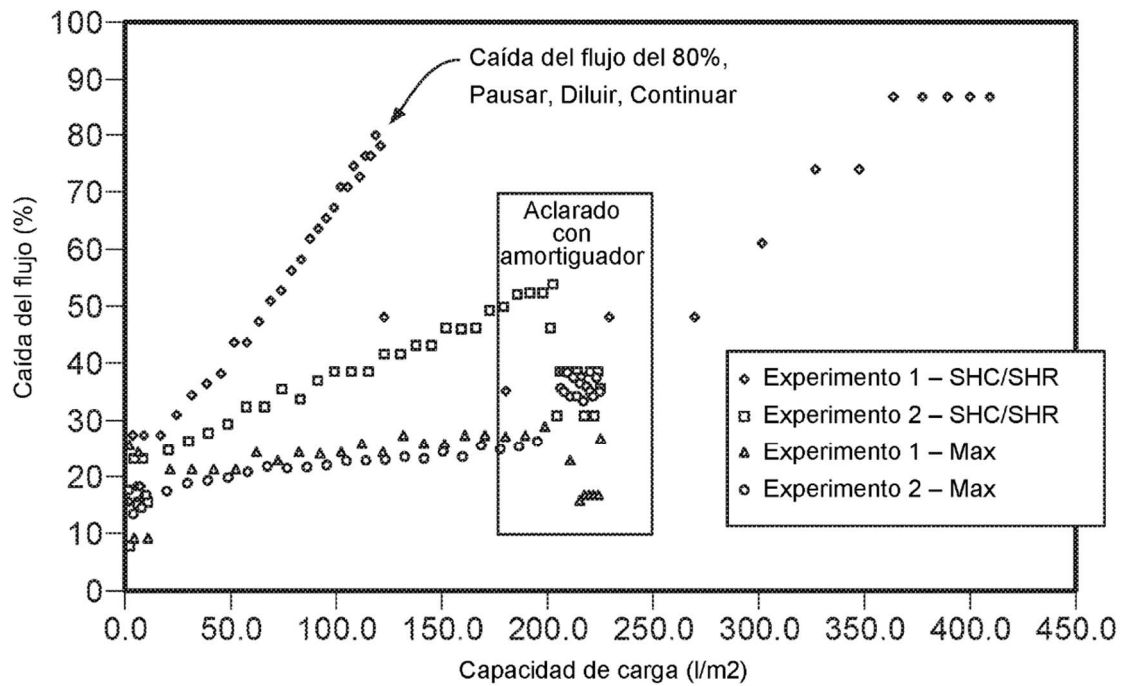


FIG. 39

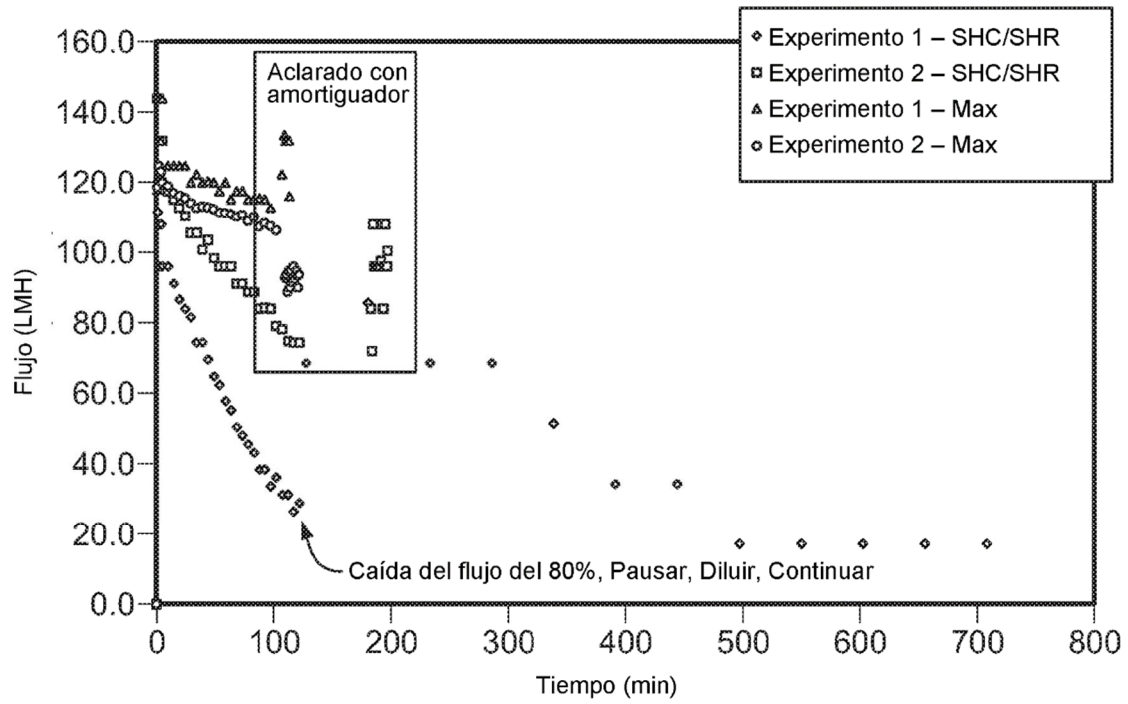


FIG. 40

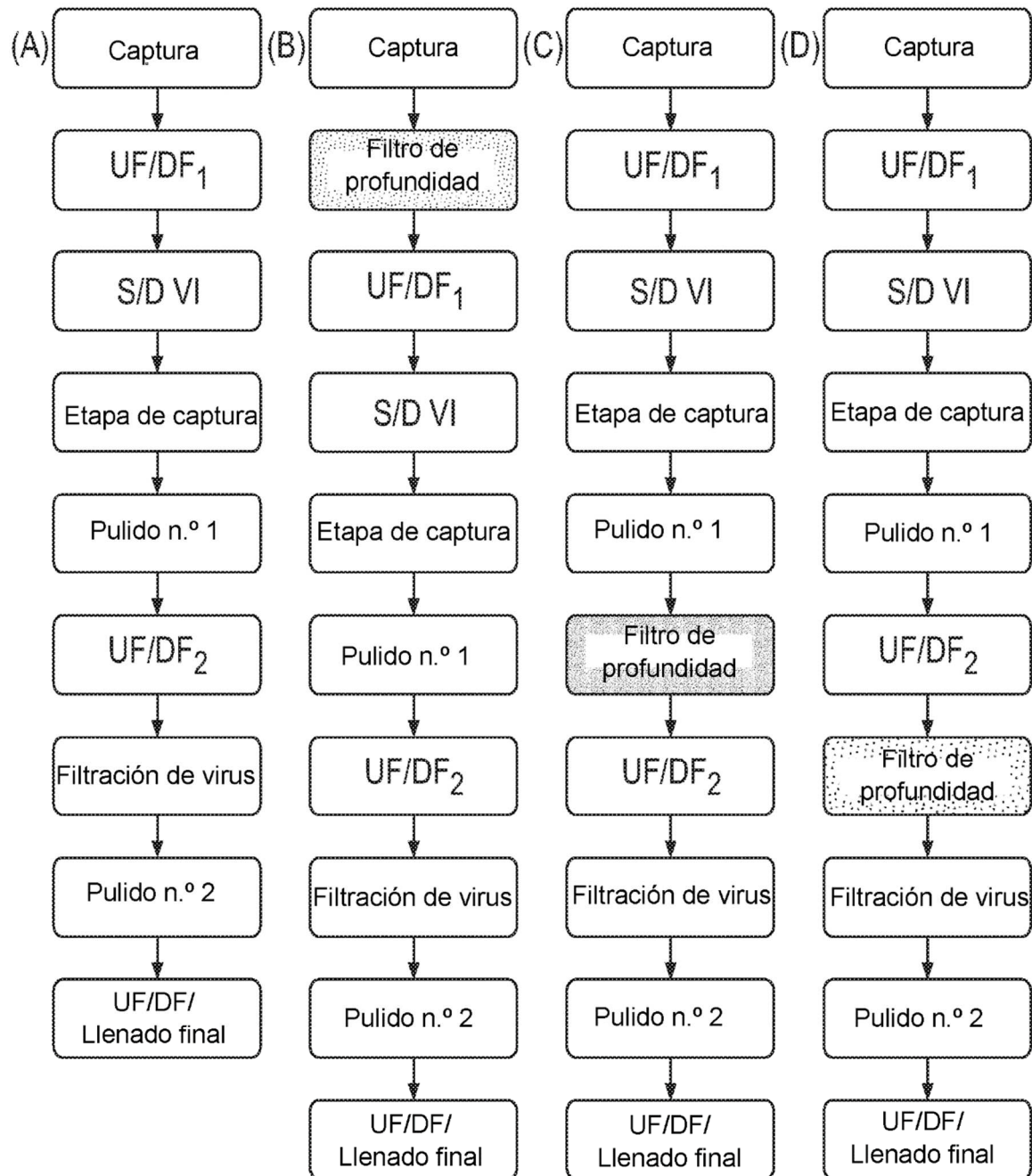


FIG. 41

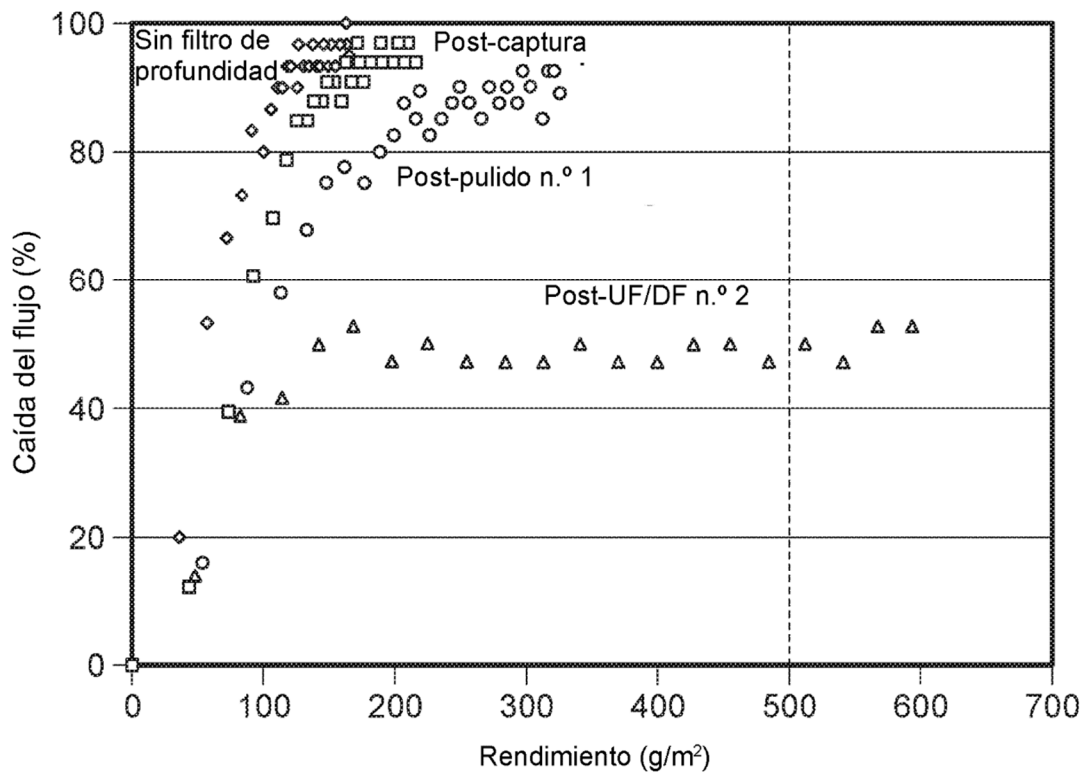


FIG. 42

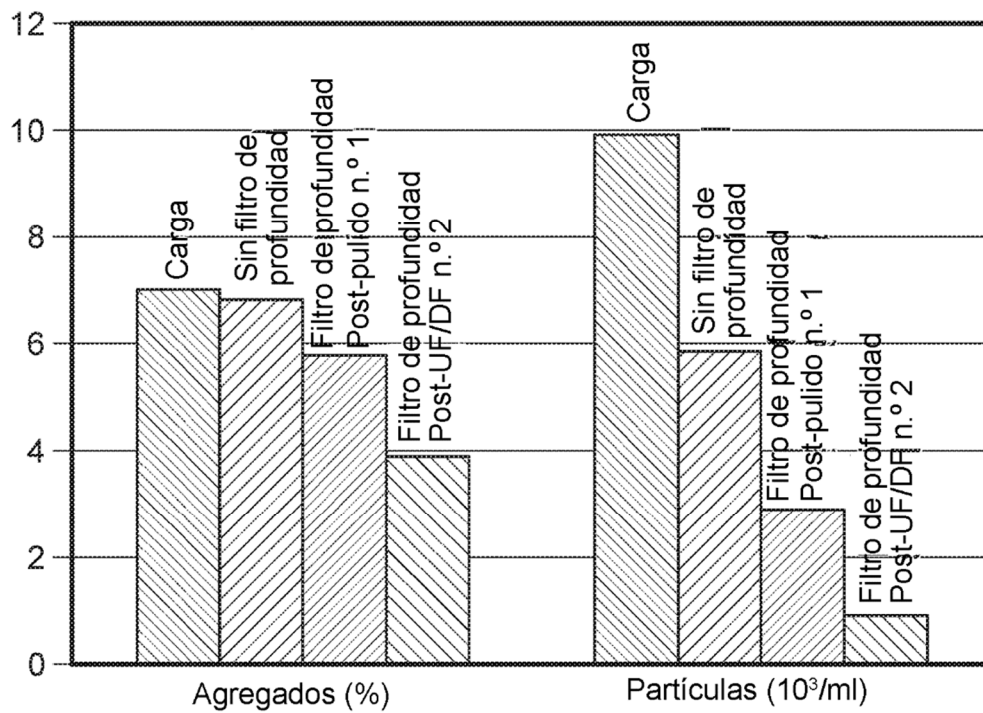


FIG. 43

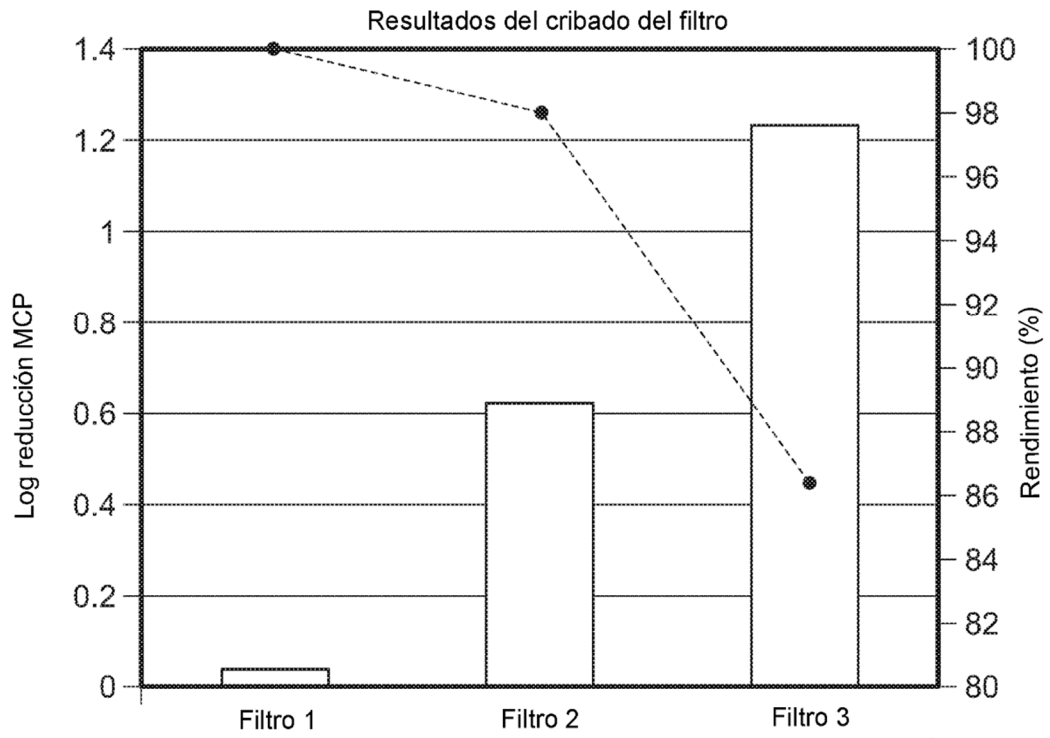


FIG. 44A

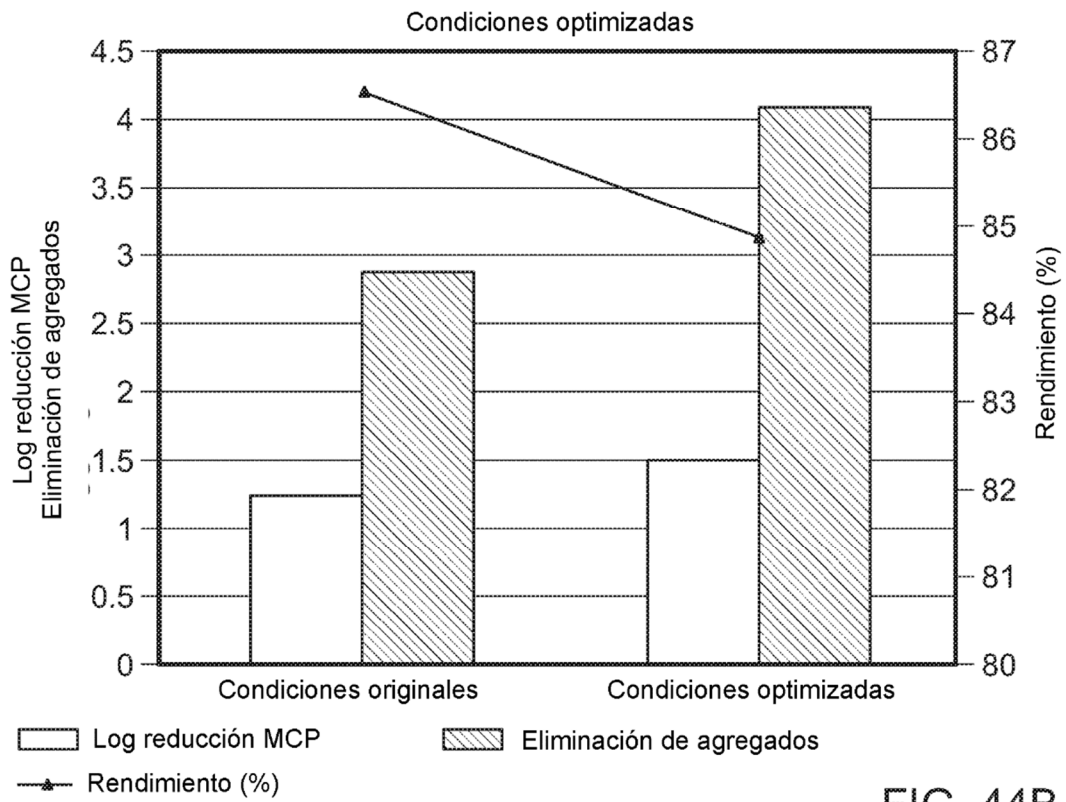


FIG. 44B