



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 271 565**

51 Int. Cl.:
G01N 33/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03721168 .7**

86 Fecha de presentación : **01.05.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1502103**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2005**

54 Título: **Proceso para el monitoreo de la eliminación de contaminantes durante el proceso de purificación de un producto farmacéutico producido por una célula hospedera.**

30 Prioridad: **03.05.2002 EP 02076739**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73 Titular/es: **DSM IP Assets B.V.
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:
**Gunnewijk, Maria, Gerarda, Wilhelmina y
Coco Martin, Jose, Manuel**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 271 565 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).

ES 2 271 565 T3

DESCRIPCIÓN

Proceso para el monitoreo de la eliminación de contaminantes durante el proceso de purificación de un producto farmacéutico producido por una célula hospedera.

La invención se refiere a un proceso para el monitoreo de la eliminación de contaminantes durante el proceso de purificación de un producto farmacéutico producido por una célula hospedera.

Monitorear la eliminación de contaminantes durante el proceso de purificación de un producto farmacéutico producido por una célula hospedera es necesario para obtener la aprobación comercial del producto farmacéutico. Para obtener la aprobación comercial del producto farmacéutico, se debe demostrar que el proceso de purificación es reproducible y que el producto farmacéutico es producido con una calidad constante (es decir pureza). Por lo tanto, existe la necesidad de métodos confiables para monitorear la eliminación de contaminantes durante el proceso de purificación de un producto farmacéutico.

Los métodos de detección usados para el monitoreo de la eliminación de contaminantes durante el proceso de purificación de un producto farmacéutico producido por una célula hospedera son conocidos en el arte. Los métodos conocidos hacen uso de los métodos inmunológicos, por ejemplo ELISA o el Western Blot en la mayoría de los casos combinados con otros métodos no basados en la inmunología, por ejemplo HPLC (fase inversa) o la electroforesis en gel 1- y 2D- (vea por ejemplo, Bioresponse, vol.8, 1988, p. 137).

Una desventaja de los métodos inmunológicos conocidos es que los anticuerpos usados se generan solamente contra ciertas proteínas. Típicamente, los anticuerpos solamente se generan contra las proteínas de las células hospederas inmunogénicas. Por lo tanto, los contaminantes que no sean esas proteínas de las células hospederas inmunogénicas no pueden ser detectados por métodos inmunológicos.

En los métodos inmunológicos, anticuerpos policlonales generados contra las proteínas (células hospederas) en un animal hospedero (por ejemplo conejo, cabra, ratón) son usualmente usados. Por lo tanto, los métodos inmunológicos solamente pueden detectar las proteínas (células hospederas) que sean capaces de inducir una respuesta inmunológica en el animal hospedero. Típicamente, esto representa la detección de sólo el 20-30% del total de las proteínas (células hospederas). Debido a que los anticuerpos policlonales no son usualmente generados en humanos, las restantes proteínas de las células hospederas no detectadas pueden muy bien causar una reacción inmunológica en los humanos. En adición, otros contaminantes además de las proteínas (célula hospedera), tampoco son detectados.

La desventaja del método inmunológico y los otros métodos de detección conocidos no basados en la detección inmunológica es que no poseen una alta sensibilidad combinada con la capacidad de detectar proteínas individuales; los métodos conocidos detectan las proteínas individuales con una sensibilidad relativamente baja (Western Blot, HPLC, electroforesis en gel 1- y 2-D) o detectan una señal de proteína total con una sensibilidad más alta (por ejemplo, ELISA).

Es un objeto de la invención proporcionar un proceso para el monitoreo de la eliminación de contaminantes durante la purificación de un producto farmacéutico producido por una célula hospedera, cuyo método posee la capacidad de detectar las proteínas individuales con una sensibilidad relativamente alta.

Este objeto es logrado por la invención incubando al menos dos muestras diferentes tomadas durante el proceso de purificación del producto farmacéutico con al menos una serie de biochip de proteína y mediante la detección subsiguiente de los contaminantes unidos a la serie de biochip de proteína.

Las series de biochip de proteína son conocidas en el arte (US2001/0053535) y se encuentran comercialmente disponibles de, por ejemplo, Biacore (Upsala, Suecia) y CIPHERGEN Biosystems (Fremont, California, Estados Unidos). Hasta ahora, las series de biochip de proteína han sido usadas para el aislamiento de un producto y para el análisis de los componentes de la célula (por ejemplo en estudios de la expresión génica diferenciales) (US 6,225,047).

Ha sido encontrado sorprendentemente que las series de biochip de proteína son extremadamente capaces de monitorear la eliminación de contaminantes durante el proceso de purificación de un producto farmacéutico producido por una célula hospedera y que la detección de proteínas individuales ocurre con una sensibilidad relativamente alta. Además las series de biochip de proteína son capaces de unir a las proteínas y otros contaminantes, mientras que los métodos inmunológicos conocidos pueden detectar solamente proteínas y mientras los otros métodos conocidos no basado en la inmunología pueden detectar solamente proteínas o solamente contaminantes.

El término "producto farmacéutico" significa, proteínas (por ejemplo anticuerpos, receptores, enzimas, proteínas de fusión etc), que pueden ser usadas como un ingrediente activo en preparaciones farmacéuticas, ADN (plásmido) con una aplicación médica, por ejemplo, para usarlo en terapia génica, o vacunas.

El término "contaminante" significa todos los compuestos presentes en el producto farmacéutico con la excepción del propio producto farmacéutico deseado. Los contaminantes son, por ejemplo, las proteínas (células hospederas), los contaminantes del medio de cultivo de la célula en el que el producto farmacéutico es producido por la célula.

ES 2 271 565 T3

la hospedera, los aditivos añadidos durante el proceso de purificación, por ejemplo lixiviados de columna, agentes estabilizadores, agentes para inactivar virus, moléculas orgánicas pequeñas etc.

Los procesos de purificación para un producto farmacéutico producido por una célula hospedera generalmente comprenden diferentes pasos de purificación con variación en las combinaciones y el orden. Ejemplos de pasos de purificación son los pasos de separación (por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad y/o cromatografía de intercambio iónico), donde otros pasos son por ejemplo necesarios para concentrar el producto farmacéutico (por ejemplo mediante ultrafiltración o diafiltración), pasos para intercambiar buffer o pasos para eliminar o inactivar los virus (por ejemplo mediante la filtración de virus, el desplazamiento del pH o el tratamiento con detergente solvente).

El monitoreo de la purificación de un producto farmacéutico de acuerdo a la invención es realizado incubando al menos dos muestras diferentes tomadas durante el proceso de purificación del producto farmacéutico con al menos una serie de biochip de proteína y la detección subsiguiente de los contaminantes unidos a la serie de biochip de proteína. La comparación de los resultados obtenidos de la detección muestra el efecto de la purificación. El momento en que las muestras son tomadas no es realmente crítico ya que el efecto de la purificación puede ser observado a partir de la comparación de los resultados de la detección de las diferentes muestras. En la práctica, preferiblemente, las muestras son tomadas entre dos pasos de purificación. Más preferiblemente, las muestras son tomadas al menos antes del primer paso de purificación y después del último paso de purificación. Lo más preferido, las muestras son tomadas antes del primer paso de purificación y después de cada paso de purificación subsiguiente.

Las series de biochip de proteína poseen una superficie interactiva a la cual se pueden unir las proteínas. La superficie interactiva puede ser por ejemplo de una naturaleza química, por ejemplo un ligando de un cierto receptor o una superficie cromatográfica o una superficie biológica. Las superficies cromatográficas incluyen, pero no están limitadas a superficies hidrofóbicas alifáticas; superficies hidrofóbicas aromáticas; superficies intercambio catiónico, cargadas negativamente; superficies de intercambio aniónico cargadas positivamente; superficies cromatográficas inmovilizadas de afinidad con el metal y superficies de modo mixto, que comprenden por ejemplo una superficie de intercambio catiónico, cargada negativamente y una superficie de intercambio aniónico, cargada positivamente. Las superficies cromatográficas también son descritas por ejemplo en US 6,225,047. Las superficies biológicas incluyen, pero no están limitadas a los anticuerpos enlazados de manera covalente, ADN, enzimas, receptores, ligandos y anticuerpos variables de cadena simple o anticuerpo como ligandos (los últimos dos pueden ser obtenidos a partir de una biblioteca de exposición de fagos).

La naturaleza de la superficie interactiva determina qué contaminantes son unidos. Si, por ejemplo, la serie de biochip de proteína posee una superficie interactiva que comprende anticuerpo o anticuerpos variables de cadena simple como ligandos obtenidos de una biblioteca de despliegue de fagos contra las proteínas de las células hospederas, la mayoría de las proteínas de las células hospederas serán detectadas (y no sólo las proteínas de las células hospederas capaces de inducir una respuesta inmunológica en un animal hospedero).

En una realización preferida de la invención, una muestra obtenida después de un paso de purificación dado es incubada con al menos dos, más preferiblemente al menos tres, lo más preferido al menos cuatro series de biochip de proteína diferentes con superficies interactivas diferentes en el proceso de acuerdo a la invención. El uso de más series de biochip de proteína diferentes una al lado de la otra posee la ventaja que más contaminantes diferentes puedan ser detectados.

Los contaminantes unidos a la superficie de la serie de biochip de proteína pueden ser detectados directamente. Ejemplos de técnicas apropiadas para la detección directa incluyen los enfoques fotométricos que monitorean el cambio del índice de refracción, por ejemplo los enfoques que usan resonancia de plasmones de superficie (SPR), el cambio de fluorescencia o polarización; y los enfoques de espectrometría en masa, por ejemplo SELDI (desorción ionización mediante láser sobre superficie mejorada).

Alternativamente, los contaminantes pueden también ser detectados de manera indirecta; en ese caso los contaminantes unidos a la serie de biochip de proteína son extraídos de la serie y llevados a un detector en una corriente de eluato. Ejemplos de técnicas apropiadas para la detección indirecta incluyen la ionización electrospray (ESI) o la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI). Preferiblemente en el proceso de acuerdo a la invención, los contaminantes son detectados directamente, preferiblemente usando un enfoque de espectrometría en masa.

Preferiblemente, en el proceso de acuerdo a la invención, un método de detección directa, más preferiblemente de espectrometría en masa es usado para la detección de los contaminantes unidos a la serie de biochip de proteína en el proceso de acuerdo a la invención.

El proceso de acuerdo a la invención es preferiblemente usado para el monitoreo de la eliminación de proteína, más preferiblemente la eliminación de la proteína de la célula hospedera del producto farmacéutico.

Las células hospederas, que pueden ser usadas para producir productos farmacéuticos son en principio todas las células conocidas por la persona versada en el arte, que tienen la capacidad de producir una proteína farmacéutica, (plásmido) ADN o vacuna. Ejemplos de células hospederas son las células eucariotas, por ejemplo hongos filamentosos, por ejemplo *Aspergillus Niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium chrysogenum*, levaduras,

por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Phaffia rhodozyma*, *Pichia pastoris*, células mamíferas, por ejemplo células de CHO (Ovario de Hámster Chino), hibridomas, células de BHK (Riñón de Hámster Bebé), células de mielomas, células humanas, por ejemplo las células HEK-293, células linfoblastoideas humanas y células procarióticas, por ejemplo *Escherichia coli*, *Bacillus sp.*, por ejemplo *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. alkalophilus*, *Streptomyces sp.*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas sp.* Ejemplos de células eucarióticas son por ejemplo también descritos en Chu, L., Robinson, D.K., (2001) Curr. Opin. Biotechn., vol. 12, p. 180-187.

Ejemplos de proteínas que pueden ser usadas como un ingrediente activo en las preparaciones farmacéuticas (con el nombre de la marca comercial del fármaco correspondiente entre paréntesis) son por ejemplo Tenecteplase (TN Kase™), factor antihemofílico (recombinante) (ReFacto™), interferón limfoblastoideo α -n1 (Wellferon™), Factor de coagulación (recombinante) (NovoSeven™), Etanercept, (Enbrel™), Trastuzumab (Herceptin™), Infliximab (Remicade™), Palivizumab (Synagis™), Basiliximab (Simulect™), Daclizumab (Zenapaz™), Rituximab (Rituxan™), Factor de coagulación IX (recombinante) (Benefix™) e Interferón β -1a (Avonex™).

Ejemplos de ADN con una posible aplicación médica son los ADN plásmidos terapéuticos génicos. Algunos ADN plásmidos terapéuticos génicos son usados en la actualidad en pruebas clínicas para su aplicación médica.

Ejemplos de vacunas son la vacuna contra la hepatitis A inactivada (VAQTA™), la vacuna contra la rabia (RanAvert™) y la vacuna contra el Rotavirus tetravalente (RotaShield™) vivas, orales.

La invención también se refiere al uso de una o más series de biochip de proteína para el monitoreo de la eliminación de contaminantes durante el proceso de purificación de un producto farmacéutico producido por una célula hospedera. Preferiblemente con el uso de al menos dos, más preferiblemente al menos tres, lo más preferido al menos cuatro series de biochip de proteínas diferentes con superficies interactivas diferentes. Preferiblemente, los contaminantes son proteínas, más preferiblemente proteínas de la célula hospedera.

La invención será ahora elucidada por medio del siguiente ejemplo sin estar, sin embargo, limitada a éste.

Ejemplos

1.0 Introducción

En este estudio se sigue la eliminación de contaminantes durante la purificación parcial de un IgG1 humano recombinante (2) por SELDI-TOF-MS (CIPHERGEN). El IgG1 es expresado en la línea celular PER.C6 la cual fue generada a partir de células humanas primarias derivadas de la retina. La línea celular PER.C6 es capaz de generar anticuerpos monoclonales completamente humanos (incluyendo los glicanos) (1,2).

Los contaminantes presentes en las muestras recogidas durante el proceso de purificación fueron analizados mediante el uso de ProteinChips. Los ProteinChips (CIPHERGEN) poseen una superficie interactiva a la cual las proteínas pueden estar unidas. Se usa el ProteinChip de fase normal (NP20), el ProteinChip de intercambio aniónico fuerte (SAX2), el ProteinChip de intercambio catiónico débil (WCX2) y el ProteinChip de interacción hidrofóbica (H4) bajo diferentes condiciones de unión.

2.0 Materiales y Métodos

2.1 Fermentación y Purificación

Las células PER.C6 que expresan el IgG1 (2) humano fueron cultivadas en un medio EX-CELL VPRO (JRH Biosciences, Inc., Estados Unidos de América) de 2 L en un cultivo por lotes durante 13 días a 37°C con una velocidad de agitación de 75 rpm usando dos rotores de paletas. Las células y el sobrenadante fueron separados por centrifugación durante 5 minutos a 300 g a temperatura ambiente (R.T.), el sobrenadante fue subsiguientemente filtrado a través de un filtro de 22 μ m (Millipak 20, Millipore). De este material clarificado una muestra fue tomada para el análisis mediante SELDI-TOF-MS (Muestra 1, Tabla 1). Un volumen de una cosecha de 100 ml clarificada y filtrada fue aplicado en una columna de proteína A recombinante (13.8 cm de altura del lecho y un volumen de 13.1 mL, Pharmacia Biotech) la cual fue conectada a un sistema de cromatografía Akta Explorer (Pharmacia Biotech). Antes de la aplicación de la cosecha clarificada la columna fue equilibrada con 3 volúmenes de columna de 20 mM de Tris (pH 7.5), 150 mM de NaCl a 1.67 mL/min. Mientras la cosecha clarificada era aplicada a 1.67 mL/min una muestra fue tomada del flujo directo (Muestra 2, Tabla 1). Después de lavar la columna con 10 volúmenes de columna 20 mM de Tris (pH 7.5), 150 mM de NaCl a 1.67 mL/min la columna fue llevada a 0.1 M de citrato pH 5.0 en 10 volúmenes de columna a 1.67 mL/min. El IgG1 fue eluido de la columna por 5 volúmenes de columna 0.1 M de citrato pH 3.3 y fue neutralizada subsiguientemente con 1 M de Tris-HCl (pH 9) (Muestra 3, Tabla 1). La elusión de las proteínas fue seguida por la medición de la absorción a 280 nm.

ES 2 271 565 T3

TABLA 1

Intermedios recogidos para el análisis a través de SELDI-TOF-MS durante la purificación de IgG1

Muestra	Indicación	[Producto] (g/l)*	Buffer
1	Medio	0	n.a.
2	Cosecha clarificada	0.5	n.a.
3	Flujo	Directo 0	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 7.5)
4	Eluato	1	0.08 M Na-citrato, 0.2 M Tris-HCl (pH 8)

* Determinado a partir de la absorción a 280 nm ($\epsilon=1.171\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
n.a., no aplicable.

2.2 Intermedios en un ProteinChip NP20

En este experimento dos matrices diferentes de absorción de energía (EAM) fueron usadas, ácido sinapínico saturado (SPA) y un 20% de solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxi cinámico (CHCA) ambos en 50% de acetonitrilo (ACN), 0.5% de ácido trifluoroacético (TFA). Las muestras fueron analizadas como es descrito en el proceso experimental a continuación (2.2.1). Para obtener una concentración del producto de 0.15 g/L, la muestra 2 y la muestra 4 fueron diluidas 3.3 y 6.6 veces, respectivamente, con solución de buffer fosfato salino (PBS), pH 7.4. Luego, de cada muestra (muestra 2 y 4 diluidas y 1 y 3 sin diluir) 3 μL fueron añadidos a una mancha. Las muestras 1, 2, 3 y 4 fueron aplicadas sobre la mancha A, B, C y D y de nuevo sobre E, F, G y H. Las manchas A a D fueron analizadas con CHCA y E a H con SPA.

2.2.1 Procedimiento experimental

- calibre el SELDI-TOF-MS para el análisis de bajo peso molecular usando el estándar de peso molecular C100-0003 (Ciphergen) de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante.
- calibre el SELDI-TOF-MS para el análisis de alto peso molecular usando el estándar de peso molecular C100-0004 (Ciphergen) de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante.
- Tome una tasa con EAM (tanto SPA como CHCA, 5 mg, Ciphergen), añada 125 μL de ACN y 125 μL de TFA 1% (recién preparado añadiendo de 5 μL de TFA a 495 μL de agua grado HPLC). Agítelo durante 5 minutos y déjelo reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Microfuge durante 5 min a máxima velocidad.
- Use el sobrenadante del SPA como la solución SPA saturada.
- Prepare la solución de CHCA al 20% tomando 100 μL de la solución CHCA saturada y agréguelos a 200 μL de ACN, 200 μL de TFA 1%.
- Almacene las soluciones EAM en la oscuridad a 4°C hasta que vayan a usarse.
- Humedezca previamente cada mancha con 3 μL de agua de grado HPLC.
- Elimine el agua de grado HPLC y aplique inmediatamente 3 μL de una muestra en cada mancha.
- Deje que las manchas se sequen al aire.
- Lave cada mancha con 5 μL de agua de grado HPLC.
- Déjela secar y repita el lavado una vez más.
- Aplique 0.8 μL de SPA/CHCA.
- Deje que el chip se seque al aire (5 min en la capucha).
- Aplique otros 0.8 μL de SPA/CHCA y séquelo.
- Analice el chip con el ajuste de los instrumentos dados a continuación.

ES 2 271 565 T3

2.2.2 Ajuste de los instrumentos

Para bajo peso molecular de 0-10 kDa (SPA como EAM)

- 5 - Fije la masa superior en 10000 Daltons, optimizada a de 1000 Daltons a 7500 Daltons.
- Fije la intensidad inicial del láser (LI) en 180.
- Fije la sensibilidad inicial del detector en 6.
- 10 - Centre el tiempo de retardo en 600 ns.
- Fije el método de adquisición de datos en Seldi Quantitation.
- 15 - Fije los parámetros de adquisición Seldi 21. delta en 2. transitorios por en 5 posición final en 81.
- Fije las posiciones de calentamiento con dos disparos a una intensidad de 185 y No incluya los disparos de calentamiento.
- 20 - Procese la muestra.

Para alto peso molecular de 10-200 kDa (SPA como EAM)

- 25 - Fije la masa superior en 200000 Daltons, optimizada de 10000 Daltons a 150000 Daltons.
- Fije la LI inicial en 230.
- Fije la sensibilidad inicial del detector en 9.
- 30 - Centre mediante el centro de optimización
- Fije el método de adquisición de datos en Seldi Quantitation.
- 35 - Fije los parámetros de adquisición Seldi 20. delta en 4. transitorios por en 10 posición final en 80.
- Fije las posiciones de calentamiento con dos disparos a una intensidad de 240 y No incluya los disparos de calentamiento.
- 40 - Procese la muestra.

Para bajos pesos moleculares (CHCA como EAM)

- 45 - Fije la masa superior en 15000 Daltons, optimizada de 1000 Daltons a 10000 Daltons.
- Fije la LI inicial en 180.
- Fije la sensibilidad inicial del detector en 9.
- 50 - Centre mediante el centro de optimización.
- Fije el método de adquisición de datos en Seldi Quantitation.
- 55 - Fije los parámetros de adquisición Seldi 21. delta en 5. transitorios por en 10 posición final en 79.
- Fije las posiciones de calentamiento con dos disparos a una intensidad de 185 y No incluya los disparos de calentamiento.
- 60 - Procese la muestra.

Los espectros fueron analizados utilizando el software de detección de pico proporcionado por el fabricante (CIPHERGEN, Fremont, CA, Estados Unidos de América) en el paquete de software Ciphergen ProteinChip Software 3.0.1. Los picos con una proporción de señal/ruido (S/N) de 2 o más fueron incluidos en los estudios de comparación. El área para los picos de resalto es dada como cero.

ES 2 271 565 T3

2.3 La detección en los ProteinChips SAX2, WCX2, NP20 y H4 bajo condiciones variables usando SPA como la EAM

Las muestras 1-4 fueron aplicadas en un ProteinChip SAX2, WCX2, NP20 y H4. Las muestras 1 y 4 fueron usadas en la misma dilución indicada para el primer NP20. Las muestras fueron analizadas de acuerdo al procedimiento experimental descrito en 2.3.1 con el ajuste de los instrumentos de 2.3.2.

TABLA 2

El primer equilibrado y dos buffers diferentes

Serie	Buffer de equilibrado	Mancha A-D Buffer unión/ lavado 1	Mancha E-H Buffer unión/lavado 2
H4	50% Acetonitrilo	PBS (pH 7.4), 1 M NaCl, 10% ACN	PBS (pH 7.4), 1 M NaCl, 30% ACN
NP20	Agua	0.5 M NaCl, 100 mM Na-acetato, pH 4	PBS, pH 7.4, 0.5 M NaCl
WCX2	n.a.	100 mM Acetato de Sodio (pH 4) + 0.1% Triton X-100	100 mM Acetato de Sodio (pH 6) + 0.1% Triton X-100
SAX2	n.a.	100 mM Tris (pH 9) + 0.1% Triton X-100	100 mM Acetato de Sodio (pH 6) + 0.1% Triton X-100

n.a., no aplicable

2.3.1 Procedimiento experimental

- Acople el bioprocesador con los diferentes chips.
- Equilibre el chip H4 y NP20 añadiendo 50 μ L de buffer de equilibrado (Tabla 2) en cada mancha y agítelo durante 5 minutos a 300 rpm.
- Luego equilibre las manchas de todos los ProteinChips añadiendo 50 μ L de buffer de unión apropiado según se indica en el Tabla 2.
- Vierta 90 μ L de buffer de unión en las cavidades.
- Añada 10 μ L de la muestra alícuota en la solución.
- Tenga extremo cuidado de no formar burbujas en el fondo de las cavidades.
- Mézclelos pipeteando hacia arriba y hacia abajo cuatro veces.
- Añada todas las muestras de la misma forma.
- Cubra el bioprocesador con una lámina sellante.
- Agite el conjunto de series durante 60 min en un agitador de vórtice (R.T., 350 revoluciones/s).
- Sacuda las soluciones en el lavabo y corte el bioprocesador en láminas sobre un paño de limpieza.
- Lave las series tres veces con 150 μ L de buffer de unión agitándolas durante 5 minutos a R.T.
- Lave rápidamente cada serie con 150 μ L de agua des-ionizada (DI) durante un minuto.
- Retire el (los) chip(s) del Bioprocesador.
- Seque el líquido sobrante que se encuentra fuera de la mancha con un papel de seda.
- Déjelo secar al aire.
- Aplique 0.8 μ L de solución SPA saturada (vea 2.2.1 para la preparación).

ES 2 271 565 T3

- Déjelo secar.
- Aplique los segundos 0.8 μ l de la solución SPA saturada.
- 5 - Déjelo secar.
- Lea el chip.
- 10 - Almacene los chips en la oscuridad a R.T. hasta el análisis.

2.3.2 Ajuste de los instrumentos

- 15 - Fije la masa superior en 200000 Daltons, optimizada de 10000 Daltons a 150000 Daltons.
- Fije la LI inicial en 230 ó 270, respectivamente.
- Fije la sensibilidad inicial del detector en 9.
- 20 - Centre mediante el centro de optimización.
- Fije el método de adquisición de datos en Seldi Quantitation.
- Fije los parámetros de adquisición Seldi 20 ó 21, respectivamente.
- 25 - Delta en 5. transitorios por en 10 posición final en 80 ó 81, respectivamente.
- Fije las posiciones de calentamiento con dos disparos a una intensidad de 235 ó 275, respectivamente.
- 30 - No incluya los disparos de calentamiento.
- Procese la muestra.

35 3.0 Resultados

Ningún pico adicional fue encontrado en el rango molecular bajo usando CHCA o SPA como la EAM en el ProteinChip NP20. Por lo tanto, los otros ProteinChips fueron analizados con SPA como la EAM, permitiendo la detección de impurezas tanto en el rango molecular alto como en el bajo.

40 A partir de la diferencia de los espectros del medio y la cosecha clarificada, las proteínas/impurezas producidas por la célula hospedera (incluyendo el producto) fueron identificadas. En el espectro del flujo directo, muchos de estos picos de impureza fueron encontrados indicando que las impurezas fueron separadas del producto (vea las figuras y/o tablas añadidas). El producto está presente alrededor de 148 kDa en su forma de carga simple (IgG1 + H), también
45 está presente en 74 kDa en su forma de carga doble (IgG1 + 2H) e incluso a veces en su forma de carga triple alrededor de 49 kDa (IgG1 + 3H), estos picos son indicados en negritas.

Para el primer ProteinChip NP20 (NP20(1)) los datos obtenidos con SPA (mancha E-H) analizados con LI 230 son dados. Para las otras superficies cromatográficas los datos obtenidos con LI 230 o LI 270 son dados. El porcentaje de impurezas sólo puede ser calculado cuando un pico del producto está presente, de esta manera solamente para la cosecha clarificada (muestra 2) y el eluato (muestra 3). La siguiente fórmula (1) fue usada para el cálculo.

$$55 \quad 100\% * (\text{Picos de IgG } \text{Área total}-1/\text{Área total}) \quad (1)$$

60

65

ES 2 271 565 T3

TABLA 3

% de impurezas calculadas para la cosecha clarificada (muestra 2) y el eluato (muestra 3) encontradas para los diferentes ProteinChips

Muestra		ProteinChip				
		NP20 (1) ^o	NP20 (2) [*]	SAX2 ^o	WCX2 [*]	H4 [*]
Muestra 2	Cosecha clarificada	87	94/92	94/97	97/90	n.a./89
Muestra 3	Eluato	15	14/17	21/33	25/14	17/19
	Eliminación	72	80/75	73/64	72/76	-/75

Quando sea aplicable, delante de la barra inclinada hacia adelante los resultados de las manchas A-D y después de la barra inclinada hacia adelante aquellos de las manchas E-H son dados. *, obtenido con LI 270; °, obtenido con LI 230; n.a., no aplicable ya que ninguna IgG fue detectada.

Al comparar los espectros del medio antes y después los contaminantes de la fermentación producidos por la célula hospedera pueden ser identificados y ser seguidos subsiguientemente durante la purificación. Comparando las masas de cada espectro, los picos únicos intermedios por ProteinChip pueden ser identificados, lo que puede dar un discernimiento adicional sobre la cantidad o eliminación de impurezas. Las impurezas con masas dentro de los 0.5% de diferencia son consideradas idénticas.

4.0 Conclusiones

Como se puede concluir de los espectros y tablas mostrados en el epígrafe 6.0, es posible detectar contaminantes individuales con alta sensibilidad con la técnica SELDI-TOF-MS (Figura 5). Adicionalmente, comparando al menos dos intermedios del proceso de purificación la eliminación de los contaminantes puede seguirse. Para mejorar aún más la cobertura de las impurezas, condiciones de buffer diferentes pueden ser necesarias. Adicionalmente, más impurezas de una masa inferior pueden ser obtenidas usando una intensidad de láser más baja.

Los resultados indicados en el Tabla 3 muestran claramente la eliminación de los contaminantes durante la purificación del IgG1 recombinante sobre una columna de proteína A. Más idealmente, la eliminación puede ser mostrada cuando han sido ejecutados más pasos de la purificación.

5.0 Literatura

- 1 Jones, D.H., van Berkel, P.H.C., Logtenberg, T. y Bout, A., 2002, "PER.C6 cell line for human antibody production.", *Gen.* 22, ed. 15 de Mayo.
- 2 Jones, D. y otros, 2003, "High-level expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6.", *Biotechnol. Prog.* 19, 163-168.

ES 2 271 565 T3

6.0 Tablas

TABLA 4

Propiedades de los picos obtenidos en el ProteinChip NP20 (1)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Denominación del espectro	Pico #	Masa de la sustancia	Señal/Ruido	ÁreaMZ
Medio (SPA)-E,3	1	2314.09	8.19	59.78
Medio (SPA)-E,3	2	2394.13	11.67	156.99
Medio (SPA)-E,3	3	2765.63	16.55	112.21
Medio (SPA)-E,3	4	2835.09	13.10	134.18
Medio (SPA)-E,3	5	2924.53	10.30	31.16
Medio (SPA)-E,3	6	3010.59	13.72	165.44
Medio (SPA)-E,3	7	3090.24	9.34	59.81
Medio (SPA)-E,3	8	3175.96	7.84	15.28
Medio (SPA)-E,3	9	3276.77	33.63	759.38
Medio (SPA)-E,3	10	3426.94	13.16	127.12
Medio (SPA)-E,3	11	3589.79	20.06	223.20
Medio (SPA)-E,3	12	3772.22	12.87	160.02
Medio (SPA)-E,3	13	3922.20	42.12	702.66
Medio (SPA)-E,3	14	4079.61	10.23	34.48
Medio (SPA)-E,3	15	4199.42	11.61	106.90
Medio (SPA)-E,3	16	4361.65	9.09	34.64
Medio (SPA)-E,3	17	5304.99	17.81	252.62
Medio (SPA)-E,3	18	5464.59	7.93	60.46
Medio (SPA)-E,3	19	5882.33	79.88	1737.02
Medio (SPA)-E,3	20	6041.78	29.24	617.99
Medio (SPA)-E,3	21	76281.29	2.69	8.70
área total % de impureza				5560.06 N.A.
Cosecha clarificada (SPA)-F,3	1	2790.38	3.39	9.71
Cosecha clarificada (SPA)-F,3	2	2830.94	3.26	9.68
Cosecha clarificada (SPA)-F,3	3	2858.67	3.54	8.79
Cosecha clarificada (SPA)-F,3	4	3276.84	10.14	339.68
Cosecha clarificada (SPA)-F,3	5	3623.06	3.60	29.32
Cosecha clarificada (SPA)-F,3	6	3933.88	5.49	150.39
Cosecha clarificada (SPA)-F,3	7	4222.08	3.31	9.43
Cosecha clarificada (SPA)-F,3	9	5709.98	6.28	247.72
Cosecha clarificada (SPA)-F,3	11	6960.51	4.86	194.49
Cosecha clarificada (SPA)-F,3	12	7090.48	4.82	209.67

ES 2 271 565 T3

	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	14	8664.71	3.71	193.47
5	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	17	11416.38	19.22	1252.12
	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	19	12095.45	2.54	112.74
10	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	20	13912.07	23.74	1286.60
	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	21	15466.19	3.88	241.47
15	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	24	24128.32	51.47	633.01
	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	25	33262.84	3.26	38.03
20	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	26	57018.90	3.39	16.32
	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	27	62157.35	3.51	14.83
25	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	28	66439.13	3.57	16.31
	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	29	74334.31	10.12	132.23
30	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	30	74966.20	7.43	0.00
	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	31	83605.50	3.87	16.97
35	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	32	91687.99	3.97	23.08
	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	33	94907.68	3.94	15.19
40	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	34	97667.12	3.31	17.71
	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	35	110685.01	4.21	23.26
45	Cosecha clarificada (SPA)- F,3	36	148476.77	23.89	425.31
50	Área total				4265.18
	IgG total				557.54
	% de impureza				87
	Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	1	2764.00	3.88	12.99
55	Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	2	2859.74	4.29	97.07
	Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	3	2985.07	3.19	12.97
60	Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	4	3277.60	11.74	663.11
	Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	5	3604.29	3.96	32.93
65	Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	6	3930.16	6.86	333.87

ES 2 271 565 T3

		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	7	5320.74	4.54	270.21
5		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	8	5460.20	2.23	79.63
		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	9	5704.24	5.76	329.91
10		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	10	5919.25	2.25	138.98
		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	11	6332.58	2.07	132.79
15		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	12	6962.82	4.04	181.56
		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	13	7068.46	3.78	221.30
20		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	16	8643.34	10.12	803.75
		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	17	9061.62	3.58	266.49
25		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	18	9252.41	4.04	503.32
		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	22	10943.49	3.14	200.39
30		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	23	11404.10	22.28	1804.41
		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	24	11808.19	5.28	438.03
35		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	25	12067.62	3.27	195.23
		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	26	12673.36	3.54	450.38
40		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	27	14117.23	20.48	1649.82
		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	28	15471.18	6.03	440.08
45		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	29	16079.15	2.50	139.22
		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	30	16948.95	3.30	132.27
50		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	31	17363.56	5.23	242.57
		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	33	24122.09	45.39	1035.70
55		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	34	33319.38	4.89	0.00
		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	35	33638.74	4.31	0.00
60		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	36	43198.62	3.68	89.27
		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	37	48027.33	5.44	112.84
65		Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	38	58447.15	4.67	78.67

ES 2 271 565 T3

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	39	60529.84	4.45	67.52
Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	40	69511.32	4.38	83.96
Flujo directo de la proteína A (SPA)-G,3	41	78129.68	3.71	50.26
Área total % impurezas				7210.61 N.A.
Proteína A Eluato (SPA)- H,3	3	24082.27	16.88	213.36
Proteína A Eluato (SPA)- H,3	4	49568.37	7.63	93.81
Proteína A Eluato (SPA)- H,3	5	62528.03	4.64	27.43
Proteína A Eluato (SPA)- H,3	6	69252.85	3.87	22.78
Proteína A Eluato (SPA)- H,3	7	74295.17	48.93	723.83
Proteína A Eluato (SPA)- H,3	8	100909.85	9.54	154.02
Proteína A Eluato (SPA)- H,3	9	124621.82	8.98	140.59
Proteína A Eluato (SPA)- H,3	10	136473.23	9.63	0.00
Proteína A Eluato (SPA)- H,3	11	141315.86	7.93	0.00
Proteína A Eluato (SPA)- H,3	12	148617.17	108.45	2440.16
Área total IgG total % impurezas				3815.99 3257.80 15

ES 2 271 565 T3

TABLA 5
ProteinChip NP20 (2)

Denominación del espectro	Pico #	Masa de la sustancia	Señal/Ruido	ÁreaMZ
Medio-A,3	1	5860.39	364.88	6633.61
Medio-A,3	2	9193.41	84.32	6687.72
área total				13321.32
% de impurezas				N.A.
C en C-B,3	1	5710.56	4.39	59.16
C en C-B,3	2	7042.05	8.50	425.65
C en C-B,3	3	11332.92	10.65	978.26
C en C-B,3	4	11791.28	11.39	1935.32
C en C-B,3	5	14010.33	26.47	4190.09
C en C-B,3	6	16888.37	6.91	444.55
C en C-B,3	7	17910.82	5.09	456.77
C en C-B,3	8	23978.65	32.32	2851.85
C en C-B,3	9	36858.87	2.37	57.53
C en C-B,3	10	47766.40	5.69	399.19
C en C-B,3	11	70595.87	4.70	225.95
C en C-B,3	12	74067.64	4.41	149.79
C en C-B,3	13	147954.48	12.75	647.51
área total				12821.62
IgG total				797.30
% de impureza				94
Flujo directo - C,3	1	7062.05	5.20	138.52
Flujo directo - C,3	2	8455.61	4.08	201.00
Flujo directo - C,3	3	9237.37	3.30	319.58
Flujo directo - C,3	4	11793.03	12.77	1797.05
Flujo directo - C,3	5	13814.21	18.77	0.00
Flujo directo - C,3	6	14021.30	21.18	0.00
Flujo directo - C,3	7	16891.03	12.54	964.29
Flujo directo - C,3	8	17992.06	10.69	1309.05
Flujo directo - C,3	9	23996.07	25.30	1200.81
Flujo directo - C,3	10	24949.28	16.76	0.00
Flujo directo - C,3	11	29010.75	8.23	843.93
Flujo directo - C,3	12	36891.66	10.57	778.70
Flujo directo - C,3	13	42714.39	9.21	483.74
Flujo directo - C,3	14	47411.80	11.12	442.83
Flujo directo - C,3	15	70536.15	21.00	732.48
área total				8872.45

ES 2 271 565 T3

	Eluato-D,3	5	62626.76	5.85	0.00
	Eluato-D,3	6	74181.35	50.93	1127.73
5	Eluato-D,3	7	100857.20	7.72	308.86
	Eluato-D,3	8	124659.03	20.69	639.50
	Eluato-D,3	9	137791.90	26.99	0.00
	Eluato-D,3	10	148104.09	208.42	4642.80
10					
	área total				6718.89
	IgG				5770.52
	% de impureza				14
15					
	Medio-E,3	1	5891.04	20.04	231.84
20					
	área total				231.84
	Cosecha clarificada-F,3	1	3064.36	8.81	42.14
	Cosecha clarificada-F,3	2	4412.23	7.56	18.14
	Cosecha clarificada-F,3	3	11726.80	4.01	85.49
25	Cosecha clarificada-F,3	4	14029.33	6.25	239.54
	Cosecha clarificada-F,3	5	17955.27	5.90	183.14
	Cosecha clarificada-F,3	6	23953.97	5.41	275.83
	Cosecha clarificada-F,3	7	25015.06	5.68	296.51
30	Cosecha clarificada-F,3	8	147834.60	5.91	101.90
	área total				1242.69
	IgG total				101.90
35	% de impurezas				92
	Flujo directo - G,3	1	6343.01	4.78	15.33
	Flujo directo - G,3	2	11707.14	7.54	399.20
	Flujo directo - G,3	3	13799.53	7.16	793.41
40	Flujo directo - G,3	4	17939.66	11.95	789.49
	Flujo directo - G,3	5	24927.50	9.66	968.69
	Flujo directo - G,3	6	35795.86	22.02	1215.47
	Flujo directo - G,3	7	42594.44	14.12	745.16
45	Flujo directo - G,3	8	50977.25	6.45	84.33
	Flujo directo - G,3	9	62938.72	5.45	127.72
	área total				5138.80
50					
	Eluato-H,3	1	23891.50	9.19	398.69
	Eluato-H,3	2	49295.07	9.69	330.88
	Eluato-H,3	3	74063.97	65.46	1254.34
55	Eluato-H,3	4	99316.11	9.70	342.31
	Eluato-H,3	5	124318.75	28.14	947.02
	Eluato-H,3	6	136343.78	33.38	0.00
	Eluato-H,3	7	147838.98	306.08	6394.98
60					
	área total				9668.21
	IgG total				7980.20
	% de impurezas				17
65					

ES 2 271 565 T3

TABLA 6
ProteinChip SAX2

Denominación del espectro	Pico #	Masa de la sustancia	Señal / Ruido	ÁreaMZ
Medio-A,2	1	2713.52	26.62	22.27
Medio-A,2	2	2778.72	21.91	20.02
Medio-A,2	3	2900.23	59.47	312.13
Medio-A,2	4	2987.94	31.65	89.55
Medio-A,2	5	3090.50	26.52	47.54
Medio-A,2	6	3211.08	21.60	18.64
Medio-A,2	7	3224.21	23.34	10.49
Medio-A,2	8	3308.27	128.33	1177.16
Medio-A,2	9	3412.93	18.75	15.33
Medio-A,2	10	3421.61	20.15	20.46
Medio-A,2	11	3639.36	97.37	584.61
Medio-A,2	12	3717.15	39.82	139.21
Medio-A,2	13	3813.36	101.17	872.13
Medio-A,2	14	3959.79	188.07	1775.78
Medio-A,2	15	4126.10	42.36	175.18
Medio-A,2	16	4213.61	96.53	0.00
Medio-A,2	17	4275.04	33.09	23.51
Medio-A,2	18	4340.21	25.21	36.12
Medio-A,2	19	4377.77	86.55	625.19
Medio-A,2	20	4459.46	23.02	18.67
Medio-A,2	21	4496.85	36.45	170.60
Medio-A,2	22	4621.64	22.00	79.15
Medio-A,2	23	4780.36	9.28	11.45
Medio-A,2	24	5087.29	17.97	27.89
Medio-A,2	25	5197.47	20.71	44.35
Medio-A,2	26	5241.93	13.83	15.52
Medio-A,2	27	5314.44	160.99	1280.63
Medio-A,2	28	5440.62	57.36	560.11
Medio-A,2	29	5663.81	3.84	1.12
Medio-A,2	30	5678.76	25.76	140.85
Medio-A,2	31	5844.07	444.92	6355.35
Medio-A,2	32	6047.32	181.90	0.00
Medio-A,2	33	6247.31	11.32	11.14
Medio-A,2	34	6283.35	13.40	14.86
Medio-A,2	35	6530.00	8.38	17.30
Medio-A,2	36	8999.56	73.19	5268.68
área total				19982.97

ES 2 271 565 T3

	Cosecha clarificada I-B,2	1	2590.68	15.35	31.09
	Cosecha clarificada I-B,2	2	2716.13	18.43	98.62
5	Cosecha clarificada I-B,2	3	2776.71	12.11	11.41
	Cosecha clarificada I-B,2	4	2832.17	34.92	352.50
	Cosecha clarificada I-B,2	5	2897.29	39.27	565.32
	Cosecha clarificada I-B,2	6	2978.07	23.28	170.27
10	Cosecha clarificada I-B,2	7	3062.36	26.97	333.91
	Cosecha clarificada I-B,2	8	3157.60	18.57	153.61
	Cosecha clarificada I-B,2	9	3163.38	19.60	55.00
	Cosecha clarificada I-B,2	10	3211.03	8.87	11.34
15	Cosecha clarificada I-B,2	11	3314.21	107.97	2170.66
	Cosecha clarificada I-B,2	12	3460.09	31.02	343.71
	Cosecha clarificada I-B,2	13	3629.10	31.94	374.12
	Cosecha clarificada I-B,2	14	3818.06	22.57	401.18
20	Cosecha clarificada I-B,2	15	3960.99	67.52	1328.45
	Cosecha clarificada I-B,2	16	4238.70	12.92	188.75
	Cosecha clarificada I-B,2	17	4398.02	16.79	201.38
	Cosecha clarificada I-B,2	18	4969.33	9.86	225.19
25	Cosecha clarificada I-B,2	19	5324.37	30.81	707.91
	Cosecha clarificada I-B,2	20	5461.67	13.14	317.90
	Cosecha clarificada I-B,2	21	5711.92	7.56	114.01
	Cosecha clarificada I-B,2	22	5902.53	20.93	531.52
30	Cosecha clarificada I-B,2	23	6008.25	7.48	156.21
	Cosecha clarificada I-B,2	24	8012.39	6.27	171.74
	Cosecha clarificada I-B,2	25	8591.82	7.43	258.64
	Cosecha clarificada I-B,2	26	9015.57	14.76	2135.01
35	Cosecha clarificada I-B,2	27	9986.92	4.39	179.81
	Cosecha clarificada I-B,2	28	10525.99	7.43	754.33
	Cosecha clarificada I-B,2	29	11739.92	26.33	1283.06
	Cosecha clarificada I-B,2	30	11961.13	24.46	1556.40
40	Cosecha clarificada I-B,2	31	16775.53	14.58	363.70
	Cosecha clarificada I-B,2	32	17197.99	12.69	427.99
	Cosecha clarificada I-B,2	33	17904.06	7.08	318.49
	Cosecha clarificada I-B,2	34	19802.16	3.10	92.61
45	Cosecha clarificada I-B,2	35	23900.54	141.16	3796.78
	Cosecha clarificada I-B,2	36	47691.60	26.29	375.64
	Cosecha clarificada I-B,2	37	68213.89	6.04	151.62
	Cosecha clarificada I-B,2	38	73916.24	33.54	379.67
50	Cosecha clarificada I-B,2	39	147550.06	59.11	908.81
	área total				21998.33
	IgG total				1288.48
55	% de impurezas				94

60

65

ES 2 271 565 T3

	Flujo directo - C,2	1	2906.70	11.55	540.98
	Flujo directo - C,2	2	3317.05	21.51	1621.86
5	Flujo directo - C,2	3	3468.01	7.15	476.61
	Flujo directo - C,2	4	3646.93	10.09	479.39
	Flujo directo - C,2	5	3814.15	8.90	643.06
	Flujo directo - C,2	6	3960.44	18.89	1344.77
10	Flujo directo - C,2	7	4121.23	4.04	58.85
	Flujo directo - C,2	8	4227.84	4.44	83.42
	Flujo directo - C,2	9	4388.70	7.13	158.78
	Flujo directo - C,2	10	5318.40	12.91	995.17
15	Flujo directo - C,2	11	5446.43	5.42	490.38
	Flujo directo - C,2	12	5716.62	3.83	256.65
	Flujo directo - C,2	13	5906.83	9.42	786.31
	Flujo directo - C,2	14	6035.28	3.23	225.37
20	Flujo directo - C,2	15	7998.31	2.35	235.50
	Flujo directo - C,2	16	8620.11	3.31	386.70
	Flujo directo - C,2	17	9007.51	11.02	5192.99
	Flujo directo - C,2	18	9978.93	3.90	304.91
25	Flujo directo - C,2	19	10541.24	11.09	2079.66
	Flujo directo - C,2	20	11740.26	31.34	3241.77
	Flujo directo - C,2	21	11974.79	25.62	3109.06
	Flujo directo - C,2	22	16777.65	26.38	1392.59
30	Flujo directo - C,2	23	17202.51	22.70	1669.60
	Flujo directo - C,2	24	17889.61	8.36	0.00
	Flujo directo - C,2	25	19789.91	5.36	375.33
	Flujo directo - C,2	26	23904.15	198.81	7343.86
	Flujo directo - C,2	27	28769.40	12.81	1623.63
35	Flujo directo - C,2	28	42582.78	15.32	629.36
	Flujo directo - C,2	29	47670.67	39.78	1136.63
	Flujo directo - C,2	30	58132.37	8.99	638.85
40	Flujo directo - C,2	31	70606.68	13.09	933.51
	área total				38455.56
45	Eluato-D,2	1	2576.16	34.15	16.23
	Eluato-D,2	2	2582.81	47.05	20.21
	Eluato-D,2	3	2593.40	43.89	16.72
	Eluato-D,2	4	2671.64	44.61	24.51
	Eluato-D,2	5	2695.34	33.21	11.49
50	Eluato-D,2	6	2719.63	35.97	21.73
	Eluato-D,2	7	2752.66	33.35	14.73
	Eluato-D,2	8	2867.66	35.21	18.70
	Eluato-D,2	9	2899.41	28.33	14.29
55	Eluato-D,2	10	3356.51	20.30	11.18
	Eluato-D,2	11	3753.28	20.69	13.04
	Eluato-D,2	12	3798.45	21.04	5.91
	Eluato-D,2	13	3969.62	25.29	7.68
60	Eluato-D,2	14	4190.38	22.65	5.10
	Eluato-D,2	15	4397.72	12.18	6.29
	Eluato-D,2	16	6055.07	3.59	3.74
	Eluato-D,2	17	24089.68	2.91	35.65
	Eluato-D,2	18	49537.08	5.31	110.61
65	Eluato-D,2	19	74196.14	17.91	257.83
	Eluato-D,2	20	148555.69	36.74	570.95

ES 2 271 565 T3

5			área total		1186.60
			IgG total		939.39
			% de impurezas		21
10	Medio-E,2	1	3601.76	129.52	488.87
	Medio-E,2	2	3782.73	165.97	820.31
	Medio-E,2	3	3929.78	267.89	1632.07
	Medio-E,2	4	4386.72	131.96	701.40
	Medio-E,2	5	5319.69	343.87	1513.28
15	Medio-E,2	6	5452.61	127.15	729.64
	Medio-E,2	7	5718.22	63.99	200.03
	Medio-E,2	8	5916.87	214.28	1145.58
	Medio-E,2	9	9220.66	208.58	7503.49
20	Medio-E,2	10	13685.69	6.54	77.91
			área total		14812.58
25	Cosecha clasificada-F,2	1	3272.89	121.69	2097.31
	Cosecha clasificada-F,2	2	3599.63	43.04	497.14
	Cosecha clasificada-F,2	3	3762.00	26.94	579.32
	Cosecha clasificada-F,2	4	3935.99	93.42	1403.82
	Cosecha clasificada-F,2	5	5318.92	48.22	906.76
30	Cosecha clasificada-F,2	6	5440.03	19.16	496.65
	Cosecha clasificada-F,2	7	5915.51	20.63	375.79
	Cosecha clasificada-F,2	8	8477.28	7.87	296.99
	Cosecha clasificada-F,2	9	9078.72	30.21	3635.94
35	Cosecha clasificada-F,2	10	10612.09	19.92	1295.91
	Cosecha clasificada-F,2	11	11541.35	7.64	268.91
	Cosecha clasificada-F,2	12	13035.18	2.29	70.02
	Cosecha clasificada-F,2	13	16933.20	25.38	611.22
40	Cosecha clasificada-F,2	14	17369.59	18.82	497.21
	Cosecha clasificada-F,2	15	20680.34	4.52	72.05
	Cosecha clasificada-F,2	16	23296.85	7.47	347.37
	Cosecha clasificada-F,2	17	24950.67	11.17	388.56
45	Cosecha clasificada-F,2	18	28058.54	7.81	948.93
	Cosecha clasificada-F,2	19	33191.09	5.12	165.72
	Cosecha clasificada-F,2	20	36865.60	5.49	138.16
	Cosecha clasificada-F,2	21	43107.08	11.34	258.57
50	Cosecha clasificada-F,2	22	46810.80	7.55	145.45
	Cosecha clasificada-F,2	23	70815.42	14.96	292.35
	Cosecha clasificada-F,2	24	149936.98	6.83	93.13
55			área total		15883.28
			IgG total		530.93
			% impurezas		97
60	Flujo directo - G,2	1	3264.54	34.52	1324.66
	Flujo directo - G,2	2	3594.31	19.09	591.08
	Flujo directo - G,2	3	3786.43	23.15	871.88
	Flujo directo - G,2	4	3929.11	48.81	1837.82
	Flujo directo - G,2	5	5312.77	37.12	1402.01
65	Flujo directo - G,2	6	5922.88	15.11	658.82
	Flujo directo - G,2	7	8455.26	6.80	468.09

ES 2 271 565 T3

	Flujo directo - G,2	8	9225.16	29.96	6415.58
	Flujo directo - G,2	9	10606.91	23.79	2763.20
5	Flujo directo - G,2	10	11775.39	7.95	656.69
	Flujo directo - G,2	11	12067.31	8.63	677.17
	Flujo directo - G,2	12	12960.65	2.50	150.00
	Flujo directo - G,2	13	16921.27	39.10	1428.76
10	Flujo directo - G,2	14	17364.57	25.51	1286.58
	Flujo directo - G,2	15	20859.42	4.54	485.68
	Flujo directo - G,2	16	23280.42	7.52	740.08
	Flujo directo - G,2	17	24977.53	12.94	1204.05
	Flujo directo - G,2	18	28895.75	16.22	2539.96
15	Flujo directo - G,2	19	33269.63	7.74	310.53
	Flujo directo - G,2	20	36705.26	5.55	170.61
	Flujo directo - G,2	21	42842.61	20.64	435.44
	Flujo directo - G,2	22	46646.95	11.17	274.07
20	Flujo directo - G,2	23	70706.80	15.74	331.82
	área total				27024.59
	Eluato-H,2	1	5435.07	22.37	95.27
25	Eluato-H,2	2	149534.16	8.73	192.16
	área total				287.43
	IgG				192.16

30

TABLA 7

ProteinChip WCX2

Denominación del espectro	Pico #	Masa de la sustancia	Señal/Ruido	ÁreaMZ	
Medio-A,3	1	4943.69	21.16	541.72	
Medio-A,3	2	5099.74	16.43	0.00	
Medio-A,3	3	5235.82	26.93	521.62	
Medio-A,3	4	5562.50	37.31	863.22	
Medio-A,3	5	5876.07	101.25	4512.01	
45	Medio-A,3	6	6077.45	96.20	1364.67
	Medio-A,3	7	6305.33	28.99	0.00
	Medio-A,3	8	6539.47	23.11	0.00
	Medio-A,3	9	7094.18	9.25	48.23
50	Medio-A,3	10	9179.78	182.37	17535.64
	Medio-A,3	11	63411.41	4.93	46.97
	área total			25434.09	
	% de impurezas			n.a.	
55	Cosecha clarificada-B,3	1	5715.45	13.91	725.75
	Cosecha clarificada-B,3	2	5922.93	9.86	399.69
	Cosecha clarificada-B,3	3	6283.85	9.27	832.91
60	Cosecha clarificada-B,3	4	7049.43	28.48	1693.78
	Cosecha clarificada-B,3	5	7456.76	8.16	266.59
	Cosecha clarificada-B,3	6	7724.86	12.19	673.46
	Cosecha clarificada-B,3	7	8016.99	7.15	706.98
65	Cosecha clarificada-B,3	8	8599.41	73.71	6246.24

ES 2 271 565 T3

	Cosecha clarificada-B,3	9	9183.21	23.52	4214.18
	Cosecha clarificada-B,3	10	10011.10	19.14	1015.12
5	Cosecha clarificada-B,3	11	10544.82	18.45	1165.61
	Cosecha clarificada-B,3	12	10886.60	9.17	508.97
	Cosecha clarificada-B,3	13	11330.29	118.08	9622.04
	Cosecha clarificada-B,3	14	11528.63	26.60	0.00
10	Cosecha clarificada-B,3	15	11764.22	61.95	4639.09
	Cosecha clarificada-B,3	16	11987.44	26.65	0.00
	Cosecha clarificada-B,3	17	12473.29	34.64	3525.59
	Cosecha clarificada-B,3	18	12674.07	12.35	0.00
15	Cosecha clarificada-B,3	19	12929.29	6.94	0.00
	Cosecha clarificada-B,3	20	13392.82	13.32	0.00
	Cosecha clarificada-B,3	21	13396.97	13.45	0.00
	Cosecha clarificada-B,3	22	13805.90	105.49	0.00
20	Cosecha clarificada-B,3	23	14025.27	112.85	11264.36
	Cosecha clarificada-B,3	24	14223.45	28.29	0.00
	Cosecha clarificada-B,3	25	14439.61	10.70	0.00
	Cosecha clarificada-B,3	26	15344.97	32.97	3045.22
25	Cosecha clarificada-B,3	27	15988.13	13.72	991.12
	Cosecha clarificada-B,3	28	16838.12	7.17	474.69
	Cosecha clarificada-B,3	29	17239.90	10.31	703.53
	Cosecha clarificada-B,3	30	17919.10	8.09	1154.77
30	Cosecha clarificada-B,3	31	23948.65	206.17	19847.70
	Cosecha clarificada-B,3	32	24785.44	53.00	0.00
	Cosecha clarificada-B,3	33	32022.92	12.57	0.00
	Cosecha clarificada-B,3	34	33012.67	17.39	952.02
	Cosecha clarificada-B,3	35	35783.06	8.66	0.00
35	Cosecha clarificada-B,3	36	37867.01	12.64	447.40
	Cosecha clarificada-B,3	37	42635.93	20.51	506.52
	Cosecha clarificada-B,3	38	47663.57	52.89	1345.62
	Cosecha clarificada-B,3	39	51916.52	18.01	535.20
40	Cosecha clarificada-B,3	40	56840.47	20.73	322.56
	Cosecha clarificada-B,3	41	67741.44	14.04	0.00
	Cosecha clarificada-B,3	42	73957.94	11.38	361.65
	Cosecha clarificada-B,3	43	81693.83	7.84	494.99
45	Cosecha clarificada-B,3	44	96394.63	5.40	118.99
	Cosecha clarificada-B,3	45	116691.70	6.01	88.41
	Cosecha clarificada-B,3	46	123475.71	6.10	178.61
	Cosecha clarificada-B,3	47	136406.73	6.66	0.00
50	Cosecha clarificada-B,3	48	147976.64	74.31	2140.44
	Área total				81209.80
	IgG total				2502.09
55	% de impurezas				97
	Flujo directo - C,3	1	7049.05	17.62	1853.02
	Flujo directo - C,3	2	8608.92	50.69	6299.60
60	Flujo directo - C,3	3	9183.42	32.56	6902.11
	Flujo directo - C,3	4	9536.60	7.75	0.00
	Flujo directo - C,3	5	10007.14	36.19	1830.36
	Flujo directo - C,3	6	10547.40	34.32	1836.52
	Flujo directo - C,3	7	10676.81	15.87	0.00
65	Flujo directo - C,3	8	10875.14	22.41	1140.98
	Flujo directo - C,3	9	11327.10	107.98	7648.68

ES 2 271 565 T3

	Flujo directo - C,3	10	11521.66	26.09	0.00
	Flujo directo - C,3	11	11766.73	88.45	6602.62
5	Flujo directo - C,3	12	11979.21	38.29	0.00
	Flujo directo - C,3	13	12337.45	60.00	0.00
	Flujo directo - C,3	14	12465.97	103.53	0.00
	Flujo directo - C,3	15	12666.90	34.68	0.00
10	Flujo directo - C,3	16	12914.30	15.43	0.00
	Flujo directo - C,3	17	13801.13	94.17	7009.16
	Flujo directo - C,3	18	14023.22	98.23	6887.76
	Flujo directo - C,3	19	14187.30	20.72	0.00
15	Flujo directo - C,3	20	14454.40	7.84	0.00
	Flujo directo - C,3	21	14914.67	10.87	504.37
	Flujo directo - C,3	22	15343.88	43.77	2911.98
	Flujo directo - C,3	23	15983.25	31.17	1987.64
20	Flujo directo - C,3	24	16845.93	7.89	0.00
	Flujo directo - C,3	25	17239.56	24.17	1624.72
	Flujo directo - C,3	26	17918.88	22.92	3363.35
	Flujo directo - C,3	27	23948.33	278.14	23034.55
25	Flujo directo - C,3	28	24786.75	84.96	0.00
	Flujo directo - C,3	29	29454.37	17.55	3554.96
	Flujo directo - C,3	30	32009.27	23.20	999.07
	Flujo directo - C,3	31	33027.38	20.10	0.00
30	Flujo directo - C,3	32	36368.20	16.44	1603.35
	Flujo directo - C,3	33	42639.38	37.52	1967.44
	Flujo directo - C,3	34	47712.12	50.72	2476.43
	Flujo directo - C,3	35	51989.03	15.72	555.70
35	Flujo directo - C,3	36	56849.64	28.46	1714.27
	Flujo directo - C,3	37	68268.14	22.15	2671.25
	Flujo directo - C,3	38	81887.83	9.91	710.51
	Flujo directo - C,3	39	116355.19	8.73	316.14
40	área total				98006.54
	% de impurezas				n.a.
	Eluato-D,3	1	10264.26	5.77	143.12
	Eluato-D,3	2	10701.90	5.60	140.34
45	Eluato-D,3	3	12003.09	3.52	72.02
	Eluato-D,3	4	13266.11	2.04	8.04
	Eluato-D,3	5	23950.73	17.61	881.09
	Eluato-D,3	6	49326.92	10.53	356.51
50	Eluato-D,3	7	74022.16	43.90	879.77
	Eluato-D,3	8	124216.40	15.91	449.23
	Eluato-D,3	9	136681.22	19.32	0.00
	Eluato-D,3	10	147862.22	186.72	3769.38
55	área total				6699.49
	IgG total				5005.65
	% de impurezas				25.28
60	Medio-E,3	1	4049.65	12.75	47.08
	Medio-E,3	2	4284.42	12.91	110.64
	Medio-E,3	3	5349.83	9.15	18.85
65	Medio-E,3	4	5889.82	12.45	148.65
	Medio-E,3	5	6438.94	7.43	15.31

ES 2 271 565 T3

	Medio-E,3	6	9247.11	4.85	33.39
	Medio-E,3	8	48292.01	4.63	48.50
5	Medio-E,3	9	163338.57	2.97	33.47
	área total				455.88
	% de impurezas				n.a.
10	Cosecha clarificada-F,3	1	7034.19	19.07	964.89
	Cosecha clarificada-F,3	2	8086.00	2.68	211.65
	Cosecha clarificada-F,3	3	9261.06	5.53	443.49
15	Cosecha clarificada-F,3	4	9517.88	5.42	500.84
	Cosecha clarificada-F,3	5	11323.50	3.53	263.60
	Cosecha clarificada-F,3	6	12304.80	8.34	906.01
	Cosecha clarificada-F,3	7	13375.63	6.11	0.00
20	Cosecha clarificada-F,3	8	13427.27	7.77	0.00
	Cosecha clarificada-F,3	9	13795.45	10.06	1027.23
	Cosecha clarificada-F,3	10	15310.41	7.68	399.53
	Cosecha clarificada-F,3	11	17986.43	5.32	675.81
25	Cosecha clarificada-F,3	12	20413.72	3.90	299.10
	Cosecha clarificada-F,3	13	23775.69	10.67	0.00
	Cosecha clarificada-F,3	14	24788.25	19.89	2012.32
	Cosecha clarificada-F,3	15	27198.02	6.74	418.70
30	Cosecha clarificada-F,3	16	35747.79	5.30	146.74
	Cosecha clarificada-F,3	17	54198.88	6.53	219.42
	Cosecha clarificada-F,3	18	69483.78	9.66	565.99
	Cosecha clarificada-F,3	19	73883.97	10.23	323.62
	Cosecha clarificada-F,3	20	147799.71	36.56	681.88
35	área total				10060.82
	IgG total				1005.49
	% de impurezas				90
40	Flujo directo - G,3	1	6338.12	4.46	743.43
	Flujo directo - G,3	2	7040.07	19.31	2083.81
	Flujo directo - G,3	3	8023.67	2.90	312.69
45	Flujo directo - G,3	4	8472.55	4.40	421.66
	Flujo directo - G,3	5	9545.03	16.89	3198.23
	Flujo directo - G,3	6	11324.86	7.82	1543.17
	Flujo directo - G,3	7	12312.32	43.20	3911.14
50	Flujo directo - G,3	8	13392.82	7.62	0.00
	Flujo directo - G,3	9	13793.27	17.10	3671.21
	Flujo directo - G,3	10	15343.07	5.49	594.37
	Flujo directo - G,3	11	18153.19	12.54	3594.88
55	Flujo directo - G,3	12	20305.64	15.09	1520.78
	Flujo directo - G,3	13	24761.17	60.32	11168.03
	Flujo directo - G,3	14	27276.83	18.87	1032.51
	Flujo directo - G,3	15	36030.90	10.44	442.12
60	Flujo directo - G,3	16	39493.77	8.05	400.88
	Flujo directo - G,3	17	47028.12	8.11	166.11
	Flujo directo - G,3	18	49248.06	7.08	339.56
	Flujo directo - G,3	19	54179.04	10.29	355.93
	Flujo directo - G,3	20	62896.16	10.90	250.08
65	Flujo directo - G,3	21	69381.29	24.74	1536.52

ES 2 271 565 T3

		área total		37287.11
		% de impurezas		n.a.
5		Eluato-H,3	1	13217.32
		Eluato-H,3	2	23769.50
		Eluato-H,3	3	49932.71
		Eluato-H,3	4	74024.36
		Eluato-H,3	5	124274.31
10		Eluato-H,3	6	136544.39
		Eluato-H,3	7	147894.25
				6.22
				16.19
				66.33
				371.10
				137.78
				0.00
				69.36
				1408.92
15		área total		2137.80
		IgG total		1846.34
		% impurezas		14

TABLA 8

ProteinChip H4

Denominación del espectro	Pico #	Masa de la sustancia	Señal/Ruido	ÁreaMZ
Medio-A,3	1	5887.435	154.8729	2307.542
Medio-A,3	2	6095.129	23.0743	253.8904
Medio-A,3	3	9181.094	10.98542	146.8193
Medio-A,3	4	12128.92	3.009221	14.26603
		área total		2722.52
		% de impurezas		n.a.
Cosecha clarificada-B,3	1	5727.268	6.061866	95.17794
Cosecha clarificada-B,3	2	7075.259	12.25289	360.7652
Cosecha clarificada-B,3	3	11422.08	18.32059	895.1911
Cosecha clarificada-B,3	4	11849.75	4.742421	329.1265
Cosecha clarificada-B,3	5	13941.12	45.06168	0
Cosecha clarificada-B,3	6	14149.16	45.56847	0
Cosecha clarificada-B,3	7	14361.74	14.03961	0
Cosecha clarificada-B,3	8	14581.12	6.755022	0
Cosecha clarificada-B,3	9	17425.9	3.943665	112.3759
Cosecha clarificada-B,3	10	18124.79	4.211146	209.8651
Cosecha clarificada-B,3	11	24162.46	5.437719	270.5657
Cosecha clarificada-B,3	12	25151.49	4.977597	387.8344
Cosecha clarificada-B,3	13	33246.89	3.566134	139.7081
Cosecha clarificada-B,3	14	36614.02	3.625673	47.26546
		área total		2847.88
		% de impurezas		n.a.
Flujo directo - C,3	5	11831.68	7.041495	0
Flujo directo - C,3	6	13944.61	33.52851	0
Flujo directo - C,3	7	14157.84	38.88574	0
Flujo directo - C,3	8	14341.51	13.18453	0
Flujo directo - C,3	9	15796.92	3.496057	548.5688
Flujo directo - C,3	10	17424.71	3.327024	295.0101
Flujo directo - C,3	11	18120.25	5.451363	430.2268

ES 2 271 565 T3

	Flujo directo - C,3	12	24168.43	2.999535	230.4684
	Flujo directo - C,3	13	25206.53	5.856752	489.9963
5	Flujo directo - C,3	14	33322.85	4.759771	205.0363
	Flujo directo - C,3	15	36118.38	6.221106	243.1876
	Flujo directo - C,3	16	42547.21	9.075226	350.7662
	Flujo directo - C,3	17	50303.98	6.133394	217.6043
10	área total				3010.86
	% de impurezas				n.a.
15	Eluato-D,3	1	8320.887	6.982438	31.86119
	Eluato-D,3	2	24177.29	5.173549	319.6991
	Eluato-D,3	3	50175.22	8.781152	217.0394
	Eluato-D,3	4	74648.76	35.93925	1075.105
20	Eluato-D,3	5	125014.2	18.50343	654.359
	Eluato-D,3	6	148581.7	212.9426	5286.792
	área total				7584.86
25	IgG total				6361.90
	% de impurezas				16
30	Cosecha clarificada-F,3	1	5729.254	38.10582	889.1119
	Cosecha clarificada-F,3	2	7090.659	17.18724	489.537
	Cosecha clarificada-F,3	3	11436.16	135.0857	5904.454
	Cosecha clarificada-F,3	4	11622.48	29.62182	0
	Cosecha clarificada-F,3	5	12111.24	7.872594	0
35	Cosecha clarificada-F,3	6	13936.33	44.52504	0
	Cosecha clarificada-F,3	7	14149	38.19788	0
	Cosecha clarificada-F,3	8	14366.35	11.3847	0
	Cosecha clarificada-F,3	9	14567.59	6.337693	0
40	Cosecha clarificada-F,3	10	15562.72	4.628464	401.8075
	Cosecha clarificada-F,3	11	18098.65	3.560782	182.0193
	Cosecha clarificada-F,3	12	24178.96	54.74658	2359.49
	Cosecha clarificada-F,3	13	24902.27	14.6164	0
45	Cosecha clarificada-F,3	14	47973.28	24.94115	1175.421
	Cosecha clarificada-F,3	15	71163.87	11.5169	350.529
	Cosecha clarificada-F,3	16	148962.2	5.608357	87.30161
50	área total				11839.67
	IgG total				1175.42
	% de impurezas				90

55

60

65

ES 2 271 565 T3

5	Flujo directo - G,3	1	5716.67	12.95565	306.0182
	Flujo directo - G,3	2	6334.993	4.461091	93.98705
	Flujo directo - G,3	3	7074.775	8.021065	179.1698
	Flujo directo - G,3	4	11430.86	62.70494	3765.7
	Flujo directo - G,3	5	11623.5	13.72609	0
	Flujo directo - G,3	6	13937.26	30.89184	0
10	Flujo directo - G,3	7	14139.03	25.06366	0
	Flujo directo - G,3	8	14350.55	8.848049	0
	Flujo directo - G,3	9	15828.44	2.835655	199.888
	Flujo directo - G,3	10	18127.7	4.750492	675.9793
15	Flujo directo - G,3	11	22353.46	4.161511	195.3476
	Flujo directo - G,3	12	24172.3	29.60664	1450.417
	Flujo directo - G,3	13	24850.64	11.75127	0
	Flujo directo - G,3	14	47875.19	17.97307	904.1433
20	Flujo directo - G,3	15	71002.91	11.96093	454.9218
	área total				8225.57
	% de impurezas				n.a.
25	Eluato-H,3	1	24225.39	6.476968	272.7851
	Eluato-H,3	2	49850.49	7.456789	332.1223
	Eluato-H,3	3	74565.84	19.31641	570.4264
30	Eluato-H,3	4	125006.9	11.9938	244.462
	Eluato-H,3	5	148676.1	62.33588	1378.798
	área total				2798.59
35	IgG total				2281.35
	% de impureza				18

40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso para el monitoreo de la eliminación de contaminantes durante el proceso de purificación de un producto farmacéutico producido por una célula hospedera, **caracterizado** porque al menos dos muestras diferentes tomadas durante el proceso de purificación de un producto farmacéutico son incubadas con al menos una serie de biochip de proteínas y porque los contaminantes unidos a la serie de biochip de proteína son subsiguientemente detectados.
- 10 2. Proceso de acuerdo a la reivindicación 1, **caracterizado** porque las muestras son tomadas antes del primer paso de purificación y después de cada paso de purificación subsiguiente.
- 15 3. Proceso de acuerdo a las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado** porque una muestra obtenida después de un paso de purificación dado es incubada con al menos dos, más preferiblemente al menos tres, lo más preferido al menos cuatro series de biochip de proteína diferentes con superficies interactivas diferentes.
- 20 4. Proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque los contaminantes unidos a la serie de biochip de proteína son detectados directamente.
5. Proceso de acuerdo a la reivindicación 4, **caracterizado** porque un enfoque de espectrometría en masa es usado para la detección directa de los contaminantes.
- 25 6. Proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque los contaminantes detectados son proteínas.
- 30 7. Proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado** porque los contaminantes detectados son proteínas de células hospederas.
8. Uso de una o más series de biochip de proteína para el monitoreo de la eliminación de contaminantes durante el proceso de purificación de un producto farmacéutico producido por una célula hospedera.
- 35 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada** porque se usan al menos dos series de biochip de proteína diferentes con superficies interactivas diferentes.
- 40 10. Uso de acuerdo a la reivindicación 8 ó 9, **caracterizada** porque la eliminación de la proteína de la célula hospedera es monitoreada.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

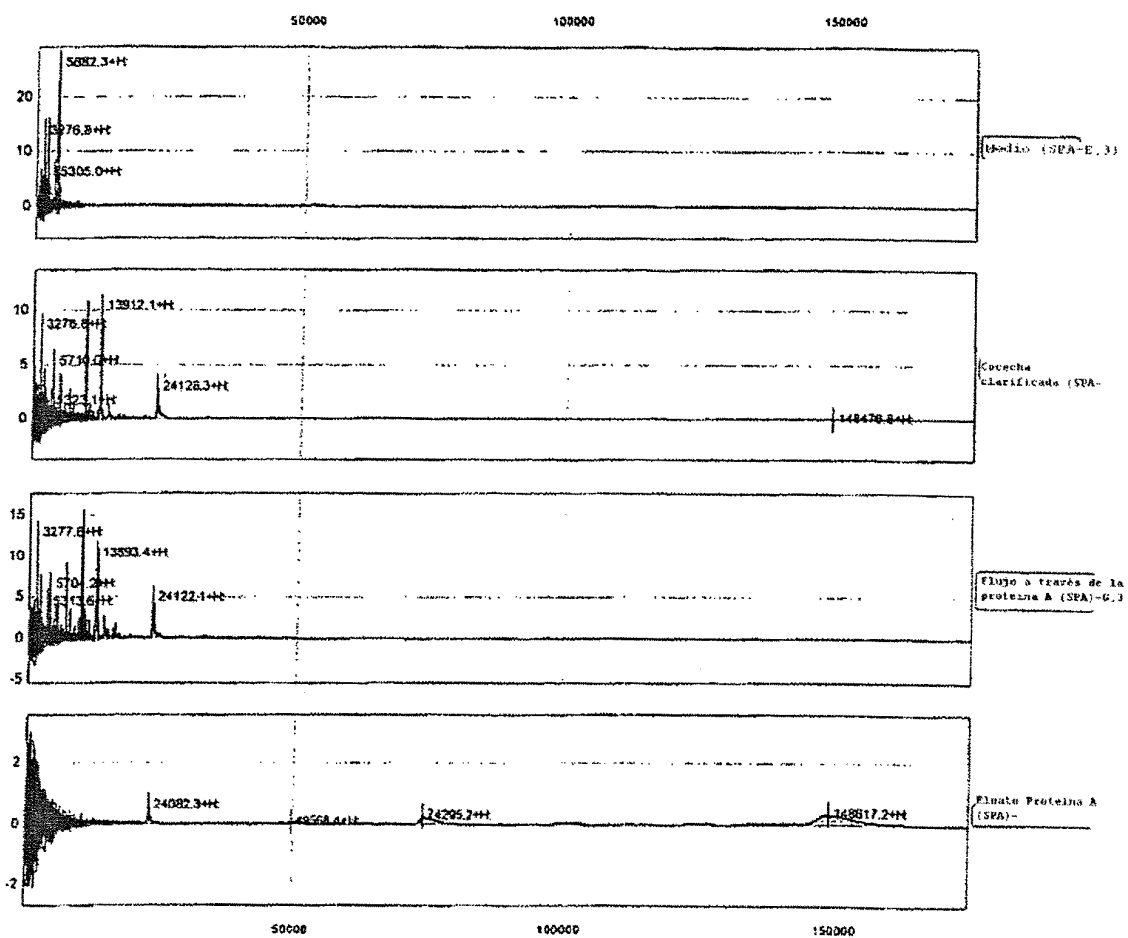


Figura 1. Espectros NP20 (1). Por motivos de claridad no se etiquetaron todos los picos.

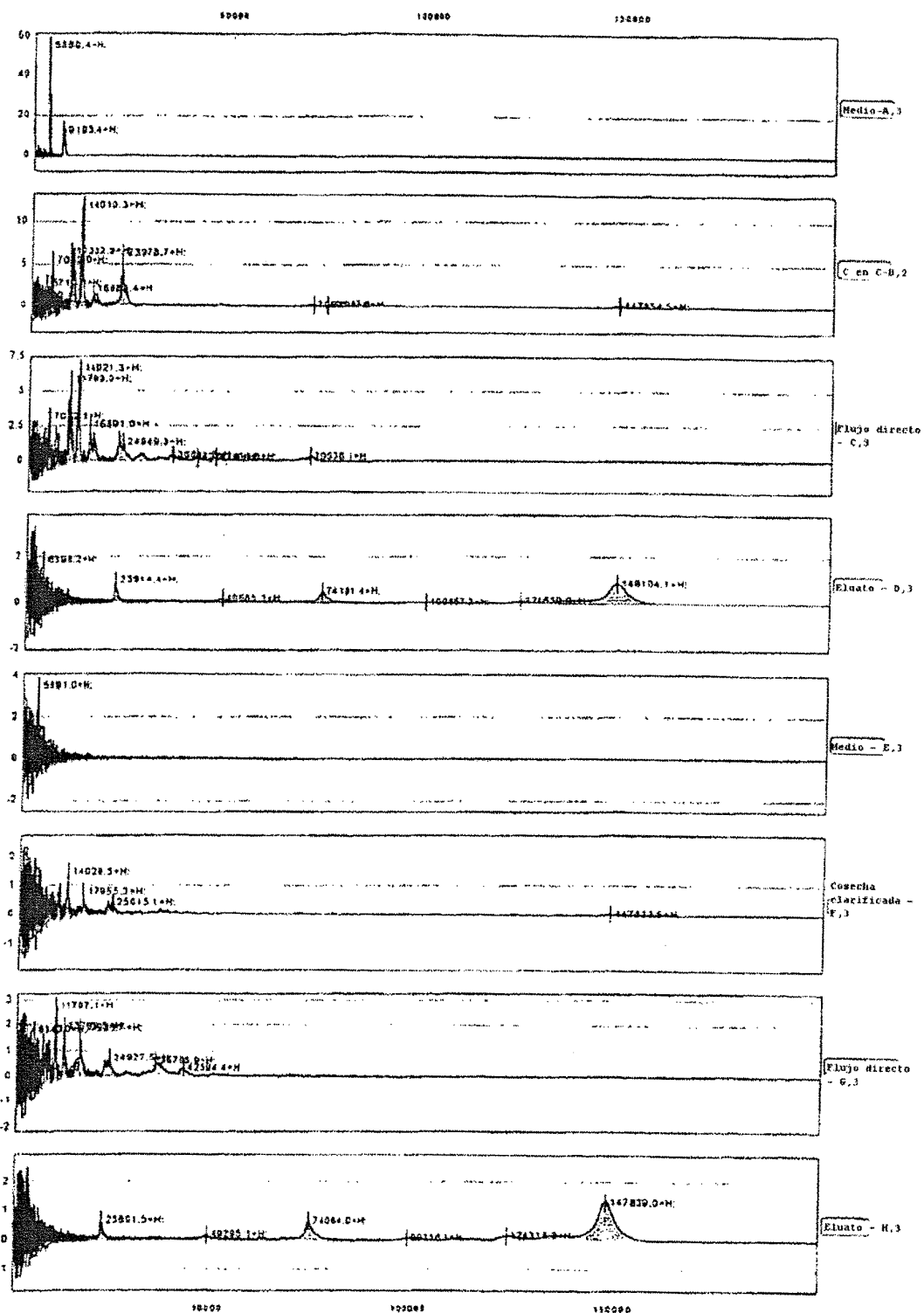


Figura 2. ProteinChip NP20(2), 100 mM Na-Acetato (pH 4), 0.5 M NaCl. Por motivos de claridad no se etiquetaron todos los picos.

ES 2 271 565 T3

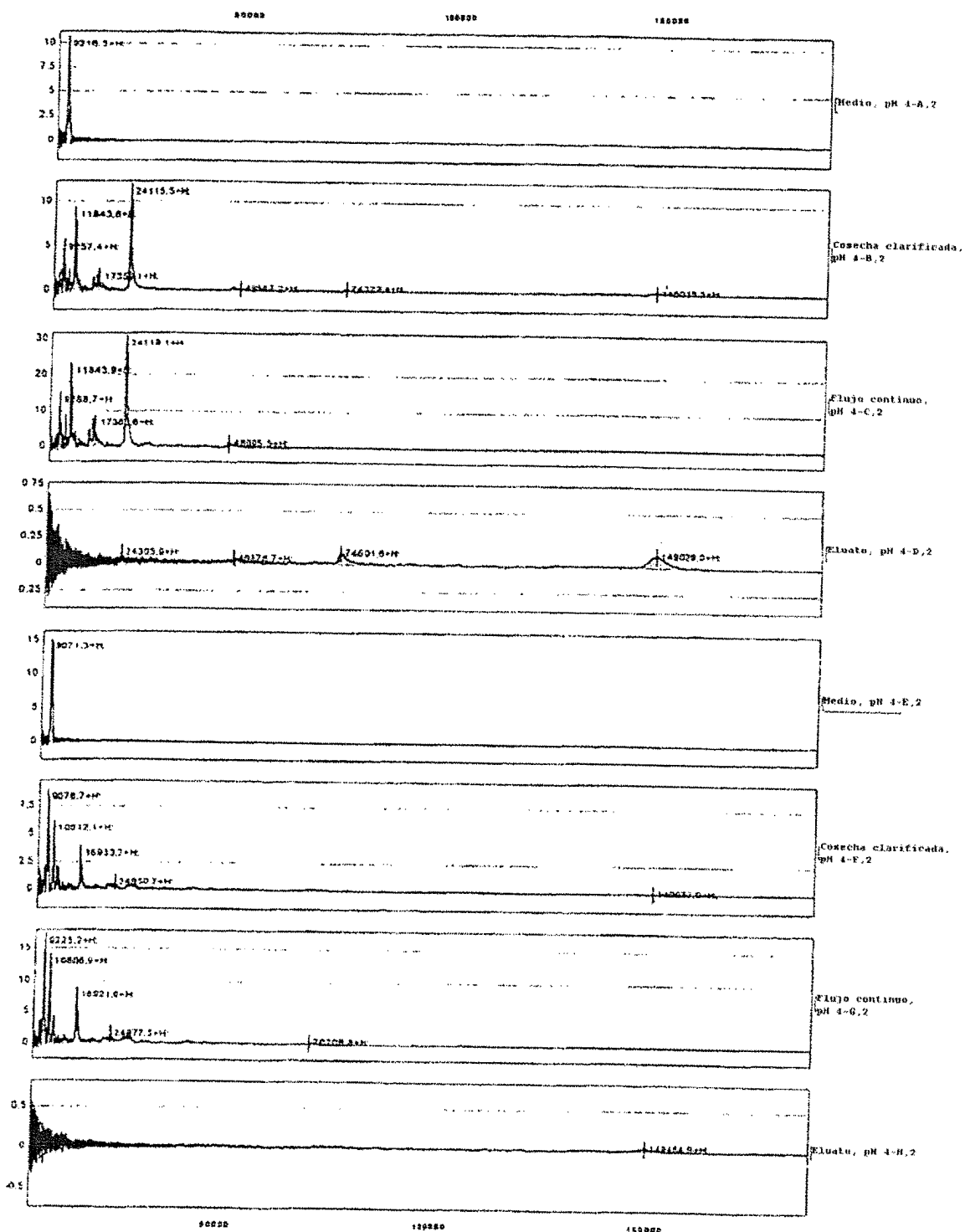


Figura 3. ProteinChip SAX2. Por motivos de claridad no se etiquetaron todos los picos.

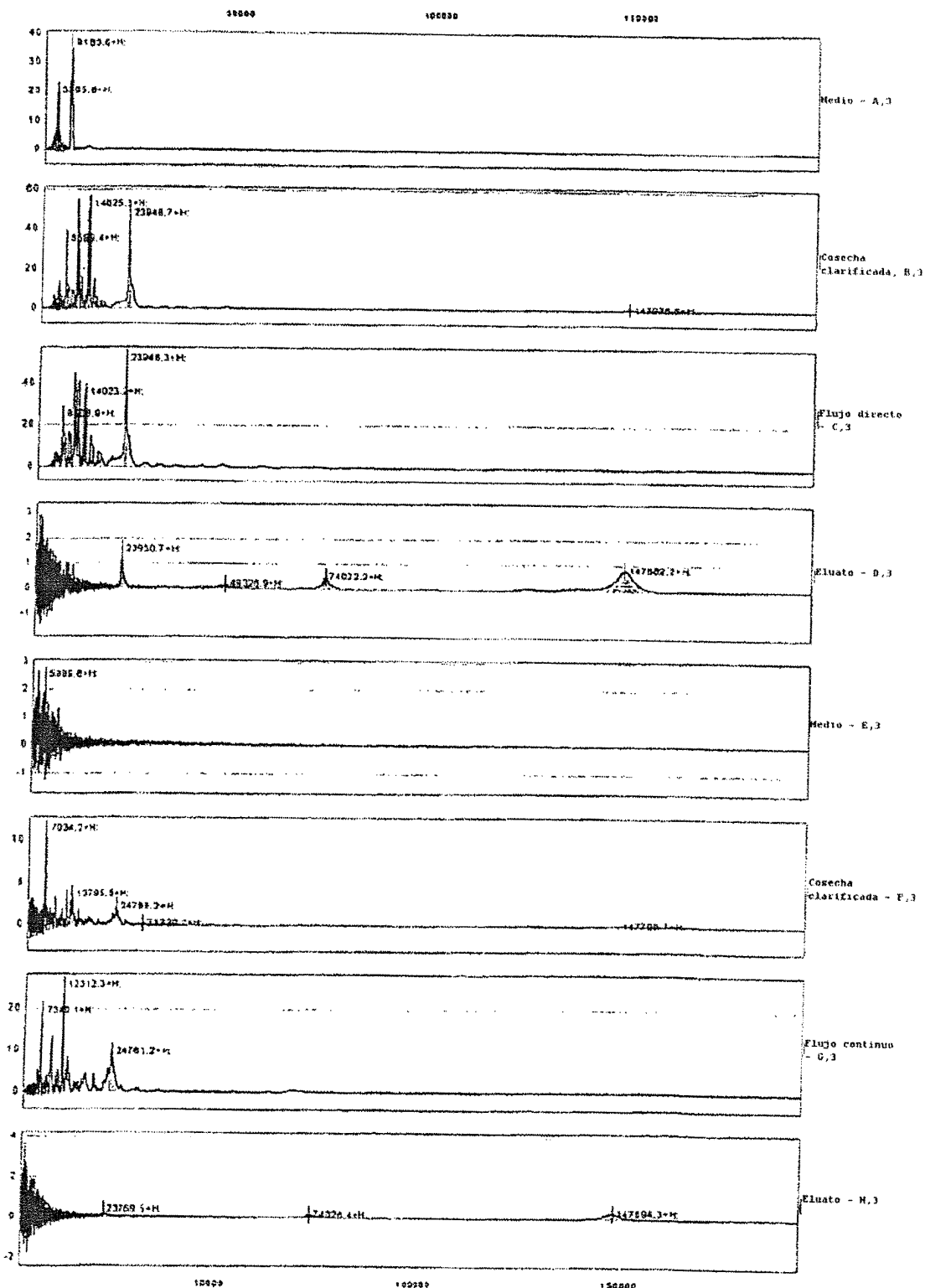


Figura 4. Espectros de ProteinChip WCX2. Por motivos de claridad no se etiquetaron todos los picos.

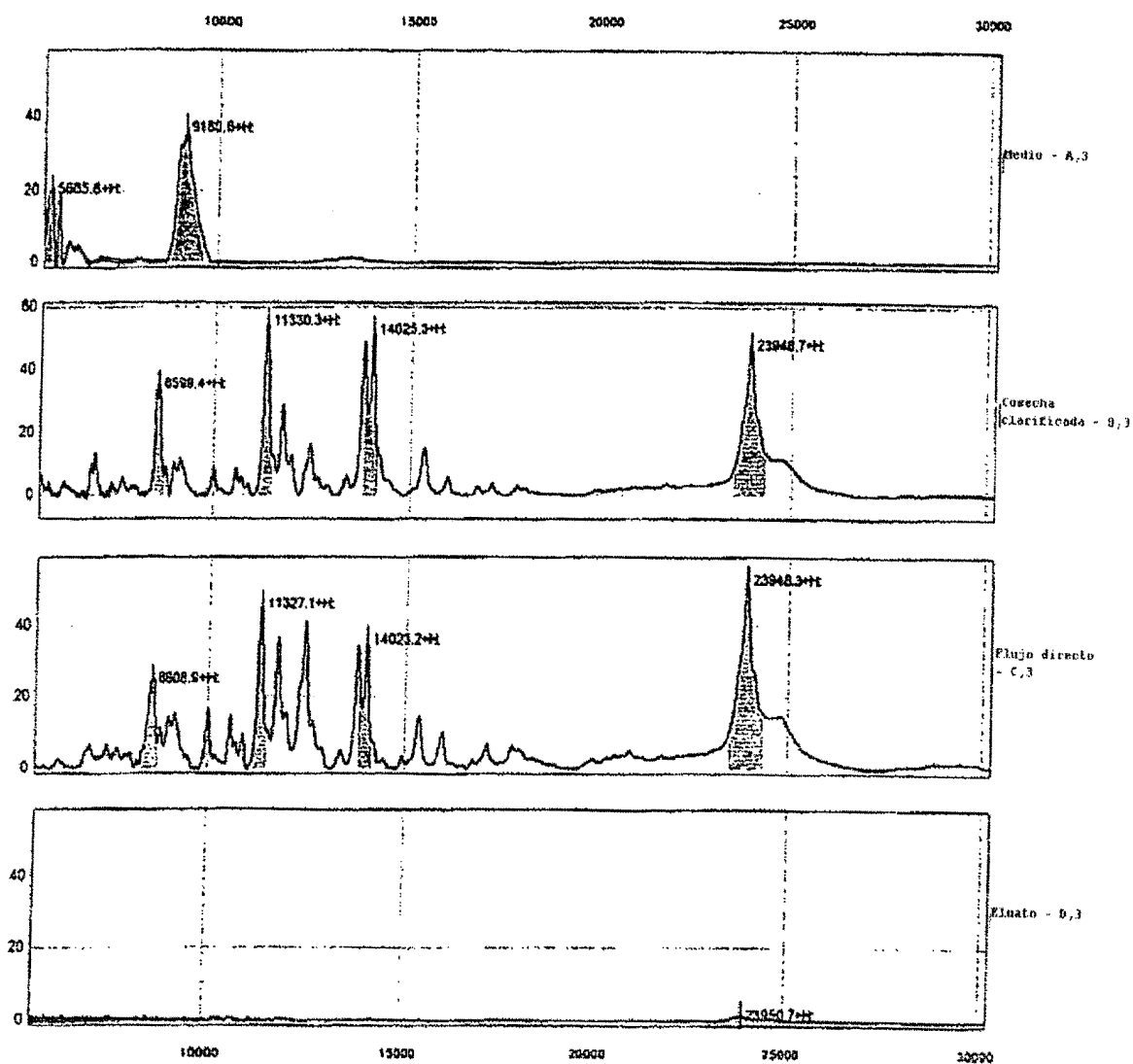


Figura 5. ProteinChip WCX2 más detalladamente. Por motivos de claridad no se etiquetaron todos los picos.

