

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 995 985**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/34** (2006.01)

**C07K 1/113** (2006.01)

**B01D 15/36** (2006.01)

**B01D 15/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2016 E 22211542 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 4209499**

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

30 Prioridad:

**13.08.2015 US 201562204831 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.02.2025**

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.00%)  
One Amgen Center Drive  
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones:

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

**ES 2 995 985 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Filtración en profundidad cargada de proteínas de unión al antígeno

### 5 REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

Mediante la presente se reivindica el beneficio con arreglo a la sección 119(e) del título 35 del U.S.C. de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 62/204.831 presentada el 13 de agosto de 2016.

### 10 LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene, como parte separada de la divulgación, un listado de secuencias en forma legible por ordenador (49841A\_SeqListing.txt; 11.962 bytes bytes; creado el 12 de agosto de 2016), que se incorpora por referencia en su totalidad.

### 15 CAMPO DE LA INVENCION

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

### 20 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las proteínas terapéuticas de unión al antígeno, tales como los anticuerpos, se usan actualmente para tratar millones de pacientes en el mundo. Las moléculas de proteína de unión al antígeno se producen normalmente en sistemas de cultivo celular de mamífero y se recuperan usando una serie habitual de etapas de filtración y cromatografía (véase, por ejemplo, Liu et al., mAbs. 2(5): 480-499(2010)). La estructura y estabilidad de las moléculas de proteína de unión al antígeno dependen en gran medida de los enlaces disulfuro que enlazan las dos cadenas pesadas y las cadenas pesadas y ligeras en cada molécula de proteína de unión al antígeno, sin embargo, durante el proceso de producción y purificación, uno o más enlaces disulfuro se puede reducir a grupos tiol libres. La reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios debilita la integridad estructural de la molécula de proteína de unión al antígeno y puede conducir a fragmentos de proteína de unión al antígeno (por ejemplo, cadena ligera, cadena pesada y sus combinaciones) y/o agregados de proteína de unión al antígeno, que alteran las funciones biológicas de las proteínas de unión al antígeno y, por consiguiente, su eficacia terapéutica. Aunque las moléculas reducidas siguen intactas durante el proceso de purificación por otras fuerzas (por ejemplo, enlaces iónicos, hidrófobos, de hidrógeno y van der Waals), se pueden fragmentar durante el almacenamiento o en el uso clínico. Por lo tanto, existe una necesidad de métodos de reoxidación de moléculas de proteína de unión al antígeno parcialmente reducidas para producir formulaciones farmacéuticas estables y eficaces.

### 40 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente divulgación se refiere a métodos de producción de una formulación acuosa de una proteína de unión al antígeno (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, un anticuerpo o un peptidocuerpo) o potenciación de la reoxidación de dicha proteína de unión al antígeno y a formulaciones que comprenden una proteína de unión al antígeno reoxidada preparada según estos métodos. En un aspecto, la divulgación proporciona un método de producción de una formulación acuosa de una proteína de unión al antígeno (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, un anticuerpo o un peptidocuerpo) que comprende (a) poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro de profundidad cargado en condiciones suficientes para lograr al menos una disminución del 20 %, opcionalmente una disminución del 30 % o 40 %, en el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, en comparación con el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas observado antes de la etapa (a); y (b) opcionalmente, medir la cantidad (tal como la cantidad total) o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas. En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de potenciación de la reoxidación de una proteína de unión al antígeno (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, un anticuerpo o un peptidocuerpo) que comprende (a) poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro de profundidad cargado en condiciones suficientes para potenciar la reoxidación de la moléculas de proteína de unión al antígeno; y (b) opcionalmente, medir la cantidad (tal como la cantidad total) o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas. En un aspecto, la cantidad (tal como la cantidad total) o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas se mide usando electroforesis capilar no reducida con dodecilsulfato de sodio (nrCE-SDS). En cualquiera de los aspectos precedentes, la cantidad total de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas después del contacto con el filtro de profundidad cargado en la etapa (a) es 10 % o menos de la cantidad total de moléculas de proteína de unión al antígeno y/o disminuye en al menos tres veces en comparación con antes de la etapa (a).

65 En algunos aspectos, la etapa (a) de los métodos descritos en el presente documento va seguida y/o precedida de someter la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno a cromatografía en proteína A.

Opcionalmente, un método según la divulgación comprende además una etapa de inactivar uno o más virus en la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno y/o someter la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno a cromatografía de intercambio catiónico y/o burbujear aire u oxígeno en la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno. Opcionalmente, un método comprende además  
 5 añadir un inhibidor de tiorredoxina o proteína similar a la tiorredoxina a la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.º 20090053786).

En un aspecto, un método de producción de una formulación acuosa de una proteína de unión al antígeno (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, un anticuerpo o un peptidocuerpo) que  
 10 comprende poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro de profundidad cargado en condiciones suficientes para lograr al menos una disminución del 20 % en el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, en comparación con el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas observado antes de la etapa de poner en contacto, en donde la disminución de al menos el 20 % se determina usando electroforesis capilar no reducida con dodecilsulfato de sodio (nrCE-SDS). En otro aspecto, un método de potenciación de la reoxidación de una proteína de unión al antígeno (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, un anticuerpo o un peptidocuerpo) que comprende poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro de profundidad cargado en condiciones suficientes para lograr un aumento de al  
 15 menos dos veces en la reoxidación de las moléculas de proteína de unión al antígeno después de la etapa de poner en contacto, en donde el aumento de al menos dos veces se determina usando electroforesis capilar no reducida con dodecilsulfato de sodio (nrCE-SDS).

En algunas aspecto, un método describe en el presente documento comprende (1) una etapa de cromatografía en proteína A, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; (2) una etapa de inactivación vírica,  
 25 opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; y (3) una etapa de cromatografía de intercambio catiónico, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; comprendiendo opcionalmente además una o más de (4) una etapa de cromatografía seleccionada opcionalmente de cromatografía de interacción intolerante a la sal, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de modo mixto, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; (5) una etapa de filtración de virus, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada; y (5) ultrafiltración y/o diafiltración, opcionalmente seguida por filtración en profundidad cargada. Opcionalmente, en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, después del contacto con un filtro en profundidad cargado, el filtrado se incuba, por ejemplo, al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6,  
 30 7, 8, 9, 10, 12, 24 o más horas.

En un aspecto, el filtro en profundidad cargado comprende una capa de tierra de diatomeas. Opcionalmente, el filtro en profundidad cargado comprende además una capa de celulosa y/o una fase inorgánica, tal como una fase inorgánica que comprende una resina de poliamina. En otro aspecto, el filtro en profundidad cargado comprende un ion positivo, tal como uno cualquiera de sodio, calcio, magnesio, mercurio, cromo, aluminio, potasio, plomo, arsénico, cadmio, cobalto, hierro, manganeso, titanio, cinc, níquel, cobre, o combinaciones de los mismos. En otro  
 35 aspecto, el filtro en profundidad cargado comprende una de las siguientes combinaciones de iones positivos: 1) cobre y cobalto, 2) cobre y cadmio, 3) cobalto y cadmio, o 4) cobre, cobalto y cadmio. En algunas realizaciones, el ion positivo es un metal con un estado de oxidación 2<sup>+</sup> o superior (tal como 3<sup>+</sup> o 4<sup>+</sup>). En algunos aspectos, el método comprende poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con uno dos, tres, cuatro, cinco, o más filtros en profundidad cargados.  
 40 45

En un aspecto, la disolución acuosa comprende una molécula de proteína de unión al antígeno que es un anticuerpo IgG, tal como un anticuerpo IgG1 o IgG2. Por ejemplo, en algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 con una cadena ligera kappa o un anticuerpo IgG1 con una cadena ligera lambda.

En algunos aspectos, la proteína de unión al antígeno se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, HER2, HER3, HER4, el receptor de EGF, LFA-1, Mol, p150, p95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina alfa v/beta 3, factor de crecimiento endotelial vascular, hormona de crecimiento, hormona estimulante tiroidea, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, factor liberador de hormona de crecimiento, hormona paratiroidea, hormona antimülleriana, proteína inflamatoria de macrófagos humana, eritropoyetina, NGF-beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas, aFGF, bFGF, factor de crecimiento epidérmico, TGF-alfa, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, IGF-I, IGF-II, des(1-3)-IGF-I, insulina, cadena A de insulina, cadena B de insulina, proinsulina, proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, factor VIII, factor tisular, factor de von Willebrand, proteína C, alfa-1-antitripsina, activadores del plasminógeno, urocinasa, activador tisular del plasminógeno, bombazina, trombina, trombotocina, M-CSF, GM-CSF, G-CSF, albúmina, IgE, receptor de flk2/flt3, receptor de obesidad, factor neurotrófico derivado de hueso, NT-3, NT-4, NT-5, NT-6, cadena A de relaxina, cadena B de relaxina, prorrelaxina, interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, IL-1 a IL-10, Antígeno vírico de la envoltura del sida, calcitonina, glucagón, factor natriurético auricular, tensioactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral-alfa, factor de necrosis tumoral-beta, encefalinasa, RANTES, péptido asociado a la gonadotropina de ratón, Dnasa, inhibina, activina; proteína A, proteína D, proteína morfogenética ósea, superóxido dismutasa, factor acelerador de la descomposición, y combinaciones de los  
 50 55 60 65 mismos.

En otro aspecto, la formulación acuosa comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en abciximab, adalimumab, alemtuzumab, basiliximab, belimumab, bevacizumab, brentuximab vedotin, canakinumab, cetuximab, certolizumab pegol, daclizumab, denosumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, golimumab, 5 ibrutumomab tiuxetan, infliximab, ipilimumab, muromonab-CD3, natalizumab, nivolumab, ofatumumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, vedolizumab y un medicamento biológico similar de cualquiera de los anteriores. En una realización, la formulación acuosa comprende rituximab o un anticuerpo que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las regiones 10 determinantes de la complementariedad (CDR) de rituximab, por ejemplo, el anticuerpo puede comprender (a) una cadena ligera que contiene las tres CDR de cadena ligera de rituximab, (b) una cadena pesada que contiene las tres CDR de cadena pesada de rituximab, o (c) ambas. En otra realización, la formulación acuosa comprende infliximab o un anticuerpo que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de infliximab, por ejemplo, el anticuerpo puede comprender (a) una cadena ligera que contiene las tres CDR 15 de cadena ligera de infliximab, (b) una cadena pesada que contiene las tres CDR de cadena pesada de infliximab, o (c) ambas. En una realización, la formulación acuosa comprende ofatumumab o un anticuerpo que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de ofatumumab, por ejemplo, el anticuerpo puede comprender (a) una cadena ligera que contiene las tres CDR de cadena ligera de ofatumumab, (b) una cadena pesada que contiene las tres CDR de cadena pesada de ofatumumab, o (c) ambas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una formulación que comprende una molécula de proteína de unión al antígeno reoxidada (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, una proteína de fusión, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un pepticuerpo) preparada usando cualquiera de los métodos 20 descritos en el presente documento.

El sumario anterior no pretende definir cada aspecto de la invención, y otras características y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que incluye los dibujos. La presente divulgación pretende relacionarse como un documento unificado, y se debe entender que se contemplan 25 todas las combinaciones de características descritas en el presente documento, aunque la combinación de características no se encuentren juntas en la misma frase, párrafo o sección de la presente divulgación. Además, la divulgación incluye, como un aspecto adicional, todas las realizaciones de la invención cuyo alcance sea más reducido de cualquier forma que las variaciones mencionadas específicamente anteriormente. Con respecto a los 30 aspectos de la divulgación descrita o reivindicada con "un" o "una", se debe entender que estos términos significan "uno o más", a menos que el contexto requiera inequívocamente un significado más restringido. Con respecto a los elementos descritos como uno o más dentro de un conjunto, se debe entender que se contemplan todas las combinaciones dentro del conjunto. Si los aspectos de la divulgación se describen como "que comprende" una característica, también se contemplan realizaciones "que consisten en" o "consisten esencialmente en" la característica. Características y variaciones adicionales de la divulgación serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la totalidad de la presente solicitud, y todas aquellas características están previstas como 35 aspectos de la divulgación.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico medido usando ECnr-SDS en el líquido de cultivo celular recogido (HCCF) y en la mezcla de proteína 45 A.

La **Figura 2** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en (a) la mezcla de proteína A, antes de pasar a través del filtro en profundidad cargado, y (b) mezcla 50 de inactivación vírica filtrada, después de pasar a través del filtro en profundidad cargado.

La **Figura 3A** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en una mezcla de proteína A filtrada en profundidad cargada durante hasta 8 días después de la filtración a temperatura ambiente o 2 °C a 8 °C. La **Figura 3B** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en una mezcla de proteína A no filtrada en 55 profundidad cargada durante hasta 8 días después de la filtración a temperatura ambiente o 2 °C a 8 °C.

La **Figura 4A** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en HCCF sometido a filtración en profundidad cargada o sin filtración, seguida por cromatografía en proteína A. La **Figura 4B** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en HCCF sometido a filtración en profundidad cargada o sin filtración, seguida por 60 cromatografía en proteína A, durante hasta 24 horas después de la filtración.

La **Figura 5A** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en una mezcla de proteína A como carga en comparación con el filtrado de filtro en profundidad. La **Figura 5B** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico 65 en una mezcla de inactivación vírica neutralizada (a) antes de la filtración (MIVn/Carga), (b) después de

la filtración estéril en membrana y (c) después de la filtración en profundidad cargada, durante hasta 24 horas después de la filtración.

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

La **Figura 7A** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico después de la filtración en profundidad cargada a un caudal 250 l/m<sup>2</sup> (simulado) y 350 l/m<sup>2</sup> a 850 l/m<sup>2</sup> (experimental) durante hasta 24 horas después de la filtración. La **Figura 7B** representa el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico después de la filtración en profundidad cargada a un caudal 150 l/m<sup>2</sup> a 450 l/m<sup>2</sup> durante hasta 24 horas después de la filtración.

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

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

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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

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

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

unión al antígeno también se aplican específicamente, en todos y cada uno de los casos, a anticuerpos, como se define en el presente documento.

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

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

El término "filtro en profundidad cargado" o "filtro en profundidad" se refiere a un filtro que comprende a) matriz porosa (por ejemplo, matriz de 2 mm a 5 mm de espesor) que filtra una disolución basándose en la captura física dentro de los canales de matriz y/o la adsorción electrocinética, por ejemplo, debido a una carga en la matriz. Son adecuados una variedad de iones positivamente cargados, preferentemente iones metálicos, para su uso en dicho filtro. Los filtros en profundidad cargados están disponibles comercialmente de, por ejemplo, Cuno, Inc. (por ejemplo, serie ZETA PLUS S, serie ZETA PLUS SP, serie ZETA PLUS LP, serie ZETA PLUS CP, serie ZETA PLUS LP BC), EMD Millipore (por ejemplo, D0HC, C0HC, F0HC, A1HC, B1HC, X0HC), Sartorius AG y Pall Corporation (por ejemplo, serie SEITZ P, serie SEITZ K, serie SUPRADUR, serie STAX, serie SUPRACAP, serie SUPRAPAK, serie SUPRADISC).

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

En un aspecto, la divulgación proporciona un método de producción de una formulación acuosa de una proteína de unión al antígeno (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, una proteína de fusión, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un pepticuerpo) que comprende (a) poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro de profundidad cargado en condiciones suficientes para lograr al menos una disminución del 20 % en el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, en comparación con el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas observado antes de la etapa (a); y (b) opcionalmente, medir la cantidad (tal como la cantidad total) o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas. En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de potenciación de la reoxidación de una proteína de unión al antígeno (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, una proteína de fusión, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un pepticuerpo) que comprende (a) poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro de profundidad cargado en condiciones suficientes para potenciar la reoxidación de la moléculas de proteína de unión al antígeno; y (b) opcionalmente, medir la cantidad de cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas. La reoxidación de moléculas de proteína de unión al antígeno (tal como proteínas de unión al antígeno que comprenden una región Fc, proteínas de fusión, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o pepticuerpos) puede evidenciarse por una disminución en la cantidad (tal como la cantidad total) o cantidad relativa (por ejemplo, porcentaje) de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, en comparación con la cantidad (tal como la cantidad total) o cantidad relativa (por ejemplo, porcentaje) de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas observada antes de la etapa (a).

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

En un aspecto, un método de producción una formulación acuosa de una proteína de unión al antígeno (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, un anticuerpo o un pepticuerpo) comprende poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro de profundidad cargado en condiciones suficiente para lograr al menos una disminución del 20 % en el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, en comparación con el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas observado antes de la etapa de poner en contacto, en donde la disminución de al menos el 20 % se determina usando nrCE-SDS. En otro aspecto, un método de potenciación de la reoxidación de una proteína de unión al antígeno (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, un anticuerpo o un pepticuerpo) que comprende poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro de profundidad cargado en condiciones suficientes para lograr al menos un aumento de dos veces en la reoxidación de la moléculas de proteína de unión al antígeno después de la etapa de poner en contacto, en donde el aumento de al menos dos veces se determina usando nrCE-SDS.

En algunos aspectos, el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducida (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, un anticuerpo o un pepticuerpo) o enlaces disulfuro reducidos en la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno disminuye en al menos 15 %, al menos 16 %, al menos 17 %, al menos 18 %, al menos 19 %, al menos 20 %, al menos 21 %, al menos 22 %, al menos 23 %, al menos 24 %, al menos 25 %, al menos 26 %, al menos 27 %, al menos 28 %, al menos 29 %, al menos 30 %, al menos 31 %, al menos 32 %, al menos 33 %, al menos 34 %, al menos 35 %, al menos 36 %, al menos 37 %, al menos 38 %, al menos 39 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o más, después de poner en contacto la disolución acuosa con un filtro de profundidad cargado según la divulgación, en comparación con el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas o enlaces disulfuro reducidos observados antes de la etapa de poner en contacto. En un aspecto, la cantidad total de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas después de poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro en profundidad cargado es inferior a 10 %, por ejemplo, inferior a 9 %, inferior a 8 %, inferior a 7 %, inferior a 6 %, inferior a 5 %, inferior a 4 %, inferior a 3 %, inferior a 2 %, o inferior a 1 %, de la cantidad total de moléculas de proteína de unión al antígeno en la disolución. Como otra medida, el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas o enlaces disulfuro reducidos en la disolución acuosa que comprende enlaces disulfuro disminuye en al menos aproximadamente 1,5 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, o más, después de que la disolución acuosa se ponga en contacto con un filtro en profundidad cargado como se desvela, en comparación con antes de la etapa de puesta en contacto.

En algunos aspectos, un filtro en profundidad cargado según la divulgación comprende al menos una capa de tierra de diatomeas y/o un ion cargado positivamente, preferiblemente un ion metálico. En algunos aspectos a modo de ejemplo, la capa de tierra de diatomeas comprende un alto porcentaje (por ejemplo, aproximadamente 90 %) de sílice y/o se calcina para retirar materia orgánica. Opcionalmente, el filtro en profundidad cargado comprende además una capa de celulosa y/o una fase inorgánica. En cualquiera de los aspectos, la fase inorgánica comprende opcionalmente un aglutinante de resina que proporciona resistencia en húmedo, por ejemplo, una resina de poliamina, tal como poliamidoamina-epiclorhidrina (PAAE). En algunas realizaciones, el filtro de profundidad cargado comprende al menos un ion metálico seleccionado del grupo que consiste en sodio, calcio, magnesio, mercurio, cromo, cadmio, aluminio, potasio, plomo, arsénico, cobalto, hierro, manganeso, titanio, cinc, níquel, cobre y combinaciones de los mismos. En otro aspecto, el filtro en profundidad cargado comprende una de las siguientes combinaciones de metales: 1) cobre y cobalto, 2) cobre y cadmio, 3) cobalto y cadmio, o 4) cobre, cobalto y cadmio. En algunas realizaciones, el metal (o uno o más o todos los metales en una combinación de metales) tiene un estado de oxidación 2<sup>+</sup> o superior (tal como 3<sup>+</sup> o 4<sup>+</sup>). Los filtros en profundidad cargados adecuados para su uso en los métodos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, los filtros MILLISTAK+ A1HC y X0HC (EMD Millipore, Billerica, MA) y el filtro ZETA PLUS (por ejemplo, ZETA PLUS 30SP) (Cuno, Inc., Meriden, CT). Uno o más de los metales (tales como el cobre) en el filtro en profundidad cargado pueden promover la reoxidación. En

algunos aspectos, un filtro en profundidad cargado según la divulgación comprende uno o más de los siguientes medios: HC, CE, DE, IM, CR, ZA, SP, HP, ZC, ELIS, LA, LP, EKS-P, EKM-P, SUPRA EK 1 P, KS 50 P, SUPRA 80 P, K 100 P, K 250 P, K 700 P y K 900 P.

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

En un aspecto, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se pone en contacto con un filtro en profundidad cargado a temperatura ambiente, es decir, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 26 °C, por ejemplo, a aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C, aproximadamente 25 °C, o aproximadamente 26 °C. En otro aspecto, la etapa de puesta en contacto ocurre a una temperatura entre aproximadamente 1 °C o 2 °C y aproximadamente 8 °C, por ejemplo, a aproximadamente 2 °C, aproximadamente 3 °C, aproximadamente 4 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 6 °C, aproximadamente 7 °C, o aproximadamente 8 °C.

En algunas realizaciones, un filtro en profundidad cargado o material de un filtro en profundidad cargado (tal como la capa de tierra de diatomeas) se prueba para la capacidad de reoxidar una proteína de unión al antígeno usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la proteína de unión al antígeno se incuba con un filtro en profundidad cargado o material de un filtro en profundidad cargado (tal como la capa de tierra de diatomeas) y entonces se toman muestras de la proteína de unión al antígeno en diversos momentos de tiempo (tal como cada 30 minutos durante 1 o 2 horas) para medir la cantidad de proteína de unión al antígeno reducida. En algunas realizaciones, el material de un filtro en profundidad cargado (tal como la capa de tierra de diatomeas) se dispone en una columna y la proteína de unión al antígeno se carga sobre la columna y empujar a través de la columna. La cantidad de proteína de unión al antígeno reducida se mide para muestras recogidas de la columna.

En algunos aspectos, un método según la divulgación comprende además someter la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno a cromatografía en proteína A. Las técnicas de cromatografía en proteína A se conocen en la técnica, y el proceso se usa rutinariamente para retirar contaminantes, tales como proteína de célula hospedadora, ADN y virus de una disolución que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con una región Fc basada en la afinidad de la proteína A por la región Fc y/o Fab de inmunoglobulinas. En algunas realizaciones, se usa un tampón de carga neutro o básico (tal como pH 7 a 8) para unir la proteína de unión al antígeno a la resina de proteína A. En algunas realizaciones, se usa un pH bajo para eluir la proteína de unión al antígeno de la resina de proteína A, tal como un pH entre 3 y 5, tal como 3 a 4, o 4 a 5. En una realización, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se somete a cromatografía en proteína A antes ponerse en contacto con un filtro en profundidad cargado. En algunas realizaciones, después de la cromatografía en proteína A, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se incuba durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 24, o más horas antes de entrar en contacto con un filtro de profundidad cargado. En algunas realizaciones, después de la cromatografía de proteína A, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se incuba durante entre 2 y 10 horas (tal como entre 2 y 24 horas, 4 y 20 horas, o 4 y 10 horas) antes de entrar en

contacto con un filtro de profundidad cargado. En otra realización, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se pone en primer lugar en contacto con un filtro de profundidad cargado y a continuación después se somete a cromatografía en proteína A. En algunas realizaciones, después de la filtración en profundidad, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se incuba durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 24, 32, 48 o más horas para promover la reoxidación antes de someterse a cromatografía en proteína A. En algunas realizaciones, después de la filtración en profundidad, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se incuba durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 24, 32, 48 o más horas para promover la reoxidación antes de someterse a una cromatografía en proteína A. Por ejemplo, en algunas realizaciones, después de la filtración en profundidad, la disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se incuba durante entre 2 y 32 horas (tal como entre 12 a 24 horas, 24 a 48 horas, o 24 a 32 horas) antes de someterse a una cromatografía en proteína A.

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

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

En un aspecto, un método según la divulgación comprende poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro en profundidad cargado. En otro aspecto, una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno se pone en contacto con más de un filtro en profundidad cargado, por ejemplo, dos, tres, cuatro, o más filtros en profundidad cargados, por ejemplo, en serie o en paralelo o separados por otras etapas de proceso, tales como centrifugación, microfiltración, ultrafiltración, diafiltración, cromatografía en proteína A, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y/o inactivación/filtración vírica. En algunos aspectos, una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno (por ejemplo, HCCF) entra opcionalmente en contacto con un filtro en profundidad cargado y entonces se somete a una etapa de cromatografía en proteína A, opcionalmente seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada, luego se somete a una etapa de inactivación vírica, opcionalmente seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada, luego se somete a una etapa de cromatografía de intercambio catiónico, opcionalmente seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada, luego se somete a otra etapa de cromatografía, seleccionada opcionalmente de cromatografía de interacción

intolerante a la sal con ligando de amina primaria (STIC PA), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y cromatografía de modo mixto (MMC), opcionalmente seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada, luego se somete a una etapa de filtración de virus, opcionalmente seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada, luego se somete a una etapa de ultra/diafiltración, opcionalmente seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada. Además, opcionalmente, existe un tiempo de mantenimiento de la incubación de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 o más horas, seguida por cualquier etapa de filtración en profundidad cargada.

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

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

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

En un aspecto, un método de producción de una formulación acuosa de una proteína de unión al antígeno (tal como una proteína de unión al antígeno que comprende una región Fc, una proteína de fusión, un anticuerpo o un peptidocuerpo) o de potenciación de la reoxidación de dicha proteína de unión al antígeno comprende (a) poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con al menos un extraíble de un filtro en profundidad cargado en condiciones suficientes para lograr al menos una disminución del 20 %, opcionalmente una disminución del 30 % o 40 %, en el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, en comparación con el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas observado antes de la etapa (a); y (b) opcionalmente, medir la cantidad (tal como la cantidad total) o cantidad relativa de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas. Un extraíble de un filtro en profundidad cargado puede ser, por ejemplo, un ion positivo descrito en el presente documento u otro componente presente en el filtro en profundidad cargado. Opcionalmente, el extraíble se retira de un filtro en profundidad cargado poniendo en contacto el filtro en profundidad cargado con una disolución ácida, por ejemplo, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En un aspecto, la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno entra en contacto con al menos un extraíble de un filtro en profundidad cargado en lugar de entrar en contacto con un filtro en profundidad cargado. En otro aspecto, la disolución acuosa de moléculas de proteína de unión al antígeno entra en contacto con al menos un extraíble de un filtro en profundidad cargado, además de entrar en contacto con un filtro en profundidad cargado.

En algunas realizaciones, las proteínas de unión al antígeno según la presente divulgación comprende polipéptidos de cadena pesada y ligera que tienen la misma secuencia de aminoácidos como las que se encuentran y constituyen los anticuerpos naturales, y/o los que son producidos por tecnologías de hibridoma, por activación de un gen endógeno (por recombinación homóloga o no homóloga, por ejemplo), por expresión de un gen exógeno bajo el control de una región de control de la transcripción endógena, por expresión de una construcción de

expresión exógena, por semisíntesis y por síntesis *de novo*, por nombrar algunas técnicas empleadas comúnmente para producir proteínas de unión al antígeno según la divulgación.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

solicitud de EE. UU. n.º US2003/0229023, particularmente en partes relevantes para los anticuerpos y peptidocuerpos específicos de Ang2, especialmente los de secuencias descritas allí y que incluyen, pero no se limitan a: L1(N); L1(N) WT; L1(N) 1K WT; 2xL1(N); 2xL1(N) WT; Con4 (N), Con4 (N) 1K WT, 2xCon4 (N) 1K; L1(C); L1(C) 1K; 2xL1 (C); Con4 (C); Con4 (C) 1K; 2xCon4 (C) 1K; Con4-L1 (N); Con4-L1 (C); TN-12-9 (N); C17 (N); TN8-8(N); TN8-14 (N); Con 1 (N), que también incluyen anticuerpos anti-Ang 2 y formulaciones tales como las descritas en la publicación internacional n.º WO 2003/030833, en cuanto a los mismos, particularmente Ab526; Ab528; Ab531; Ab533; Ab535; Ab536; Ab537; Ab540; Ab543; Ab544; Ab545; Ab546; A551; Ab553; Ab555; Ab558; Ab559; Ab565; AbF1AbFD; AbFE; AbFJ; AbFK; AbG1D4; AbGC1E8; AbH1C12; Ab1A1; AbIF; AbIKAbIP; y Ab1P, en sus diversas permutaciones como se describe allí; cada uno de los cuales se incorpora individual y específicamente por referencia en el presente documento en su totalidad, como se divulga en la publicación anterior; (vi) anticuerpos específicos de NGF, que incluyen, en particular, pero no se limitan a, los descritos en la publicación de solicitud de EE. UU. n.º US2005/0074821, particularmente en cuanto los anticuerpos específicos de NGF, que incluyen en particular, pero no se limitan a, los anticuerpos específicos de NGF designados allí 4D4, 4G6, 6H9, 7H2, 14D10 y 14D11; cada uno de los cuales se incorpora individual y específicamente por referencia en el presente documento en su totalidad, como se divulga en la publicación anterior; (vii) anticuerpos específicos de CD22, tales como los descritos en la patente de EE. UU. 5.789.554, en cuanto a anticuerpos específicos de CD22, particularmente anticuerpos específicos de CD22 humana, tales como, pero no se limitan a, anticuerpos humanizados y completamente humanos, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales humanizados y completamente humanos, que incluyen particularmente, pero no se limitan a, anticuerpos IgG específicos de CD22 humana, tales como, por ejemplo, un dímero de un disulfuro de cadena gamma de hLL2 monoclonal de humano-ratón unido a una cadena kappa de hLL2 monoclonal de humano-ratón, que incluye, pero se limita a, por ejemplo, el anticuerpo completamente humanizado específico de CD22 humana en Epratuzumab, número de registro CAS 501423-23-0; (viii) anticuerpos específicos de receptor de IGF-1, tales como aquellos descritos en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US en cuanto a anticuerpos específicos del receptor de IGF-1, que incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos específicos de IGF-1 designados allí L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51 y L52H52, cada uno de los cuales se incorpora individual y específicamente por referencia en el presente documento en su totalidad, como se divulga en la publicación anterior; (ix) anticuerpos específicos de proteína 1 relacionada con B-7 ("B7RP-1"), (B7RP-1 también se denomina en la bibliografía B7H2, ICOSL, B7h y CD275), particularmente anticuerpos IgG2 monoclonales completamente humanos específicos de B7RP, particularmente anticuerpo monoclonal IgG2 completamente humano que se une a un epítopo en el primer dominio de tipo inmunoglobulina de B7RP-1, especialmente los que inhiben la interacción de B7RP-1 con su receptor natural, ICOS, en linfocitos T activados, en particular, especialmente, en todos los aspectos anteriores, los desvelados en la solicitud provisional de EE. UU. n.º 60/700.265, presentada el 18 de julio de 2005 en cuanto a tales anticuerpos, que incluyen, pero no se limita a, anticuerpos designados allí como sigue: 16H; 5D; 2H; 43H; 41H; y 15H, cada uno de los cuales se incorpora individual y específicamente por referencia en el presente documento en su totalidad, como se divulga en la publicación anterior; (x) anticuerpos o peptidocuerpos específicos de IL-15, tales como anticuerpos monoclonales humanizados, particularmente anticuerpos tales como los desvelados en las publicaciones de patente de EE. UU. n.º US2003/0138421; US2003/023586; US2004/0071702, en cuanto a los anticuerpos y peptidocuerpos específicos de IL-15, que incluyen particularmente, por ejemplo, pero no se limitan a, anticuerpos HuMax IL-15, tales como, por ejemplo, 146B7; (xi) anticuerpos específicos de IFN gamma, especialmente anticuerpos específicos de IFN gamma humano, particularmente anticuerpos completamente humanos anti-IFN gamma, tales como, por ejemplo, los descritos en la publicación de patente de EE. UU. n.º US2005/0004353, en cuanto a anticuerpos específicos de IFN gamma, particularmente, por ejemplo, los anticuerpos descritos allí 1118; 1118\*; 1119; 1121; y 1121\*, cada uno de los cuales se incorpora individual y específicamente por referencia en el presente documento en su totalidad, como se divulga en la publicación anterior; (xii) anticuerpos específicos de TALL-1 y otras proteínas de unión específicas de TALL, tales como las descritas en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2003/0195156, en cuanto a proteína de unión a TALL-1, particularmente las moléculas de las Tablas 4 y 5B, cada uno de los cuales se incorpora individual y específicamente por referencia en el presente documento en su totalidad, como se divulga en la publicación anterior; (xiii) anticuerpos específicos de CD20, tales como los descritos en las patentes de EE. UU. n.º 5.736.137 y 5.843.439, en cuanto a anticuerpos específicos de CD20, particularmente anticuerpos específicos de CD20 humana, tales como, pero no se limitan a, anticuerpos humanizados y completamente humanos, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales humanizados y completamente humanos, que incluyen particularmente, pero no se limitan a, anticuerpos IgG específicos de CD20 humana, que incluyen, pero se limitan a, por ejemplo, el anticuerpo quimérico de ratón/humano específico de CD20 rituximab, número de registro CAS 174722-31-7, y ofatumumab, número de registro CAS 679818-59-8; (xiv) anticuerpos específicos del péptido relacionado con el gen calcitonina (CGRP); (xv) anticuerpos específicos de plaquetas (por ejemplo, específicos de glucoproteína de plaquetas IIb/IIIa (PAC-1)); (xvi) anticuerpos específicos de esclerostina; y (xvii) anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, acopladores biespecíficos de linfocitos T (BiTEs), que incluyen anticuerpos biespecíficos que tienen afinidad por cualquiera de las dianas de proteína anteriores.

65 En algunos aspectos, el anticuerpo o peptidocuerpo se selecciona del grupo que consiste en proteínas que se unen específicamente a uno o más de: CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34; HER2, HER3, HER4, el receptor de EGF;

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

20 En algunos aspectos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: abciximab, adalimumab, alemtuzumab, basiliximab, belimumab, bevacizumab, brentuximab vedotin, canakinumab, cetuximab, certolizumab pegol, daclizumab, denosumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, golimumab, ibritumomab tiuxetan, infliximab, ipilimumab, muromonab-CD3, natalizumab, nivolumab, ofatumumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, vedolizumab, y un medicamento biológico similar de cualquiera de los anteriores. En un aspecto, el anticuerpo es rituximab (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 5.843.439); o comprende una región variable de la cadena pesada que es al menos 90 %, por ejemplo, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o al menos 99 %, idéntica a SEQ ID NO: 1, y una región variable de la cadena ligera que es al menos 90 %, por ejemplo, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o al menos 99 %, idéntica a SEQ ID NO: 2; o comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las CDR de rituximab (SEQ ID NO: 3-8). En otro aspecto, el anticuerpo es infliximab (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 6.284.471); o comprende una región variable de la cadena pesada que es al menos 90 %, por ejemplo, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o al menos 99 %, idéntica a SEQ ID NO: 9, y una región variable de la cadena ligera que es al menos 90 %, por ejemplo, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o al menos 99 %, idéntica a SEQ ID NO: 10. En otro aspecto, el anticuerpo es ofatumumab (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 8.529.902); o comprende una región variable de la cadena pesada que es al menos 90 %, por ejemplo, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o al menos 99 %, idéntica a SEQ ID NO: 11, y una región variable de la cadena ligera que es al menos 90 %, por ejemplo, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o al menos 99 %, idéntica a SEQ ID NO: 12.

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

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

60 En otro aspecto, la divulgación proporciona formulaciones que comprenden una molécula de proteína de unión al antígeno reoxidada preparada usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Se pueden usar muchos reactivos y métodos convencionalmente empleados para la formulación de formulaciones farmacéuticas de proteína de unión al antígeno para la formulación según diversos aspectos y realizaciones preferidas de la divulgación. De acuerdo con ellos, muchos métodos y componentes para formular y usar productos farmacéuticos que son bien conocidos y rutinarios en las ciencias pertinentes se pueden usar en el diseño, preparación y uso de formulaciones según diversos aspectos y realizaciones preferidas de la divulgación referentes

a ellos. Dichos métodos y componentes se describen en, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 21.<sup>a</sup> ed.; Beringer et al. Editors, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. (2005); ANSEL'S PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 8.<sup>a</sup> ed., Allen et al., Editors, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. (2005); y PHARMACEUTICAL FORMULATION OF PEPTIDES AND PROTEINS, Sven Frokjaer y Lars Hovgaard, editores, CRC Press, Boca Raton, Fla. (2000), particularmente en partes relevantes para componentes y métodos convencionales que se pueden usar en una formulación que comprende una molécula de proteína de unión al antígeno reoxidada según diversos aspectos y realizaciones preferidas de la invención que se refieren a la misma.

Métodos y componentes adicionales que pueden ser útiles a este respecto se desvelan, entre otros, en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586; el documento de patente WO 2005/044854; la patente de EE. UU. n.º 6.288.030; patente de EE. UU. n.º 6.267.958; el documento de patente WO 2004/055164; la patente de EE. UU. n.º 4.597.966; US 2003/0138417; la patente de EE. UU. n.º 6.252.055; patente de EE. UU. n.º 5.608.038; patente de EE. UU. n.º 6.875.432; US 2004/0197324; el documento de patente WO 02/096457; la patente de EE. UU. n.º 5.945.098; patente de EE. UU. n.º 5.237.054; patente de EE. UU. n.º 6.485.932; patente de EE. UU. n.º 6.821.515; patente de EE. UU. n.º 5.792.838; patente de EE. UU. n.º 5.654.403; patente de EE. UU. n.º 5.908.826; EP 0 804 163; y el documento de patente WO 2005/063291, particularmente en partes pertinentes a las formulaciones de proteína de unión al antígeno farmacéuticamente aceptables según la divulgación.

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

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

Las formulaciones según ciertas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la invención proporcionan composiciones que comprenden una proteína de unión al antígeno reoxidada y un vehículo. En algunas realizaciones, la concentración de la proteína de unión al antígeno está entre aproximadamente, en mg/ml: 10 y 400, o 10 y 300, o 10 y 250, o 10 y 200, o 10 y 150, o 10 y 100, o 10 y 70, o 10 y 50. Las formulaciones según ciertas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la divulgación proporcionan composiciones que comprenden una proteína de unión al antígeno reoxidada y un vehículo, y que comprenden además una o más sales farmacéuticamente aceptables; agentes de balance osmótico (agentes de tonicidad); antioxidantes; antibióticos; antimicrobianos; agentes de carga; lioprotectores; antiespumantes; quelantes; conservantes; colorantes; analgésicos; o agentes farmacéuticos adicionales.

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

Las formulaciones según ciertas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la divulgación proporcionan composiciones que comprenden una proteína de unión al antígeno reoxidada y un vehículo, en una disolución que es hipotónica, isotónica o hipertónica, preferentemente aproximadamente isotónica, y puede comprender uno o más polioles que incluyen azúcares, especialmente preferentemente uno cualquiera o más de sorbitol, manitol, sacarosa, glucosa, lactosa, trehalosa, propilenglicol o glicerol. En algunas realizaciones, las formulaciones según la divulgación comprenden además uno o más tensioactivos farmacéuticamente aceptables, preferentemente uno o más de polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácidos grasos de sorbitano, polietoxilatos o poloxámero 188. Se pueden usar excipientes adicionales en la formulaciones según la divulgación para una amplia variedad de fines, tales como el ajuste de propiedades físicas, químicas o biológicas de formulaciones, tales como el ajuste de la viscosidad, y o procesos de la invención para mejorar la eficacia y o para estabilizar dichas formulaciones y procesos contra la degradación y el deterioro debido a, por ejemplo, tensiones que ocurren durante la fabricación, el envío, el almacenamiento, la preparación previa al uso, la administración y después.

En algunas realizaciones, una formulación según la divulgación comprende una o más sales, por ejemplo, para ajustar la fuerza iónica y/o la isotonicidad y/o la viscosidad de la formulación y/o para mejorar la solubilidad y/o estabilidad física de la proteína de unión al antígeno reoxidada. Opcionalmente, la concentración de sales es inferior a 150 mM, por ejemplo, inferior a 125 mM, inferior a 100 mM, inferior a 75 mM, inferior a 50 mM, o inferior a 25 mM. En algunas realizaciones, una formulación según la divulgación comprende uno o más aminoácidos, por ejemplo, lisina, prolina, serina, alanina, glicina, arginina, metionina o combinaciones de las mismas como, por ejemplo, un agente de carga, estabilizador y/o antioxidante.

En algunas realizaciones, una formulación según la divulgación comprende uno o más antioxidantes, por ejemplo, uno o más de un agente reductor, un secuestrante de oxígeno/radicales libres, o agente quelante, que incluye, pero no se limita a, EDTA y glutatión. En algunas realizaciones, la cantidad de EDTA es entre 0,5 y 15 mM, tal como 1 y 10 mM, 2 y 8 mM, 3 y 7 mM, 3 y 4 mM, 4 y 5 mM, o 5 y 6 mM. En algunas realizaciones, la concentración de EDTA es 5 mM. En algunas realizaciones, el EDTA inhibe la tiorredoxina o proteína similar a la tiorredoxina. En algunas realizaciones, una formulación según la divulgación comprende uno o iones metálicos, que incluyen, pero no se limitan a, metales con un estado de oxidación 2<sup>+</sup> o superior (tal como 3<sup>+</sup> o 4<sup>+</sup>), tal como Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> o Al<sup>3+</sup>. En algunas realizaciones, la concentración de metal es entre 1 y 900 ppm, tal como 10 y 800 ppm, 100 y 700 ppm, 10 y 100 ppm, 100 y 200 ppm, 200 y 300 ppm, 300 y 400 ppm, 400 y 500 ppm, 500 y 600 ppm, o 600 y 700 ppm.

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

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

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

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

### Ejemplos

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

#### **Ejemplo 1**

#### **Reducción de moléculas de anticuerpo durante la producción de anticuerpos**

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

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

En un ejemplo particular, se cultivaron células hospedadoras que producen un anticuerpo IgG1 anti-CD20 con una cadena ligera kappa que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1, y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 2 (anticuerpo A) en un biorreactor durante hasta 15 días. Se recogió el líquido de cultivo celular que comprendía el anticuerpo y se clarificó usando microfiltración por flujo cruzado. El líquido de cultivo celular (HCCF) recogido se burbujeó entonces con aire y/o se enfrió para mantener  $80 \pm 15\%$  de oxígeno disuelto y/o una temperatura de  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El HCCF burbujeado/enfriado se llevó a temperatura ambiente antes de ser sometido a una cromatografía en proteína A usando una resina AKTA Explorer y MabSelect SuRE (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) según las instrucciones del fabricante para formar una mezcla de proteína A. Se analizaron la cantidad de moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas en el HCCF y la mezcla de proteína A usando ECnr-SDS para determinar el porcentaje de especies pre-pico correspondientes a moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas (Figura 1). La reducción de moléculas de anticuerpo empezó en el biorreactor. A pesar de una disminución en el porcentaje de anticuerpos parcialmente reducidos después del burbujeo de aire y el enfriamiento del líquido de cultivo celular, la reducción de los enlaces disulfuro continuó después de la recogida, y el porcentaje de especies pre-pico fue significativamente mayor en la mezcla de proteína A en comparación con el líquido de cultivo celular recogido. Por lo tanto, las condiciones controladas de oxígeno y temperatura, es decir, burbujeo de aire y enfriamiento del líquido de cultivo celular recogido, no fueron suficientes para prevenir la reducción parcial de las moléculas de anticuerpo y no potenció suficientemente la reoxidación.

## Ejemplo 2

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

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

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

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

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

### Ejemplo 3

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

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

### Ejemplo 4

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

Se sometió una disolución acuosa que comprendía anticuerpo A a cromatografía en proteína A seguida por (a) una etapa de inactivación vírica y luego filtración en profundidad cargada usando un sistema de filtro en profundidad cargado MILLISTAK+ A1HC para formar una MIVf; (b) una etapa de inactivación vírica para formar una MIVn seguida por burbujeo de aire hasta el 100 % de oxígeno disuelto; o (c) inactivación vírica solo para formar una MIVn seguida por una etapa de mantenimiento durante hasta 50 horas, o (d) la etapa de mantenimiento solo como control. Se comparó el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico medido por ECnr-SDS en la mezcla de proteína A, MIVf, MIVn oxigenada con aire y MIVn sin aire (Figura 6). El porcentaje inicial de especies pre-pico fue comparable entre la mezcla de proteína A y las MIVn, independientemente de si la MIVn se oxigenó con aire. A diferencia, la cantidad de moléculas de anticuerpo reducidas tras la filtración en profundidad cargada en la MIVf fue aproximadamente dos veces menor. El porcentaje de especies pre-pico en la

MIVf continuó reduciéndose durante el mantenimiento, alcanzando un nivel de estado estacionario más de tres veces inferior a la mezcla de proteína A o MIVn no oxigenada y más de dos veces inferior a la MIVn oxigenada. Por lo tanto, la presencia de 100 % de oxígeno saturado tuvo un impacto mínimo sobre la reoxidación de las moléculas de anticuerpo y fue mucho menos eficaz que la filtración en profundidad cargada en disminuir la cantidad de moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas.

### Ejemplo 5

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

Se evaluó el efecto del caudal, es decir, la cantidad total de disolución acuosa en contacto con un filtro en profundidad cargado por metro cuadrado de filtro, sobre la reoxidación de anticuerpos parcialmente reducidos. Disoluciones acuosas que comprendían el anticuerpo A se sometieron a filtración en profundidad cargada usando un filtro MILLISTAK+ A1HC como se ha descrito anteriormente a un caudal de 350 l/m<sup>2</sup> a 850 l/m<sup>2</sup>, y se midió el nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico por ECnr-SDS hasta 24 horas después de la filtración (Figura 7A). A medida que aumentó el caudal, se ralentizó la cinética de reoxidación de las moléculas de anticuerpo durante las primeras horas tras la filtración; sin embargo, 24 horas después de la filtración, todo el caudal probado logró el mismo porcentaje en estado estacionario de especies pre-pico, lo que demuestra la amplia aplicabilidad de los métodos de la divulgación para fines industriales. Un experimento similar realizado usando un filtro en profundidad cargado Cuno Zeta+ SP90 a un caudal 150 l/m<sup>2</sup> a 450 l/m<sup>2</sup> también logró reoxidación potenciada y una disminución en el nivel de reducción de anticuerpo parcial a todos los caudales probados (Figura 7B).

### Ejemplo 6

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

Se sometió una disolución acuosa que comprendía anticuerpo A a cromatografía en proteína A y luego a una etapa de inactivación vírica para formar una MIVn. La MIVn se sometió a (a) cromatografía CEX solo a 50 g/l usando una resina FRACTOGEL SO3 (EMD Millipore) para formar una mezcla de CEX; (b) filtración en profundidad cargada solo usando un sistema de filtro en profundidad MILLISTAK+ A1HC para formar una MIVf, o (c) filtración en profundidad cargada para formar una MIVf, seguida por cromatografía CEX, como se describe en (a) y (b), para formar una mezcla de CEX. La etapa de CEX se diseñó para resolver las especies de alto peso molecular (HMW) en un modo de unir y eluir. Las moléculas de anticuerpo parcial pueden dimerizar en la resina por el tiol libre y eluir como especies HMW. El nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico se midió por ECnr-SDS antes y después de la cromatografía CEX de la MIVn (Figura 8A) e inmediatamente después de la cromatografía CEX de MIVf de filtro en profundidad cargado (Figura 8B), así como 4 horas después de la cromatografía CEX de MIVf de filtro en profundidad cargado (Figura 8C). El porcentaje de especies de HMW también se determinó como una medida de moléculas de anticuerpo parcial. El porcentaje de especies reducidas pre-pico en la MIVn no filtrada en filtro en profundidad cargado antes y después de la cromatografía CEX fue comparable (Figura 8A). El nivel de anticuerpo reducido en la MIVf fue más de tres veces inferior que en la MIVn después de la filtración en profundidad cargada. El porcentaje de especies pre-pico en la MIVf de filtro en profundidad cargado disminuyó adicionalmente en más de 1,5 veces inmediatamente después de la cromatografía CEX (Figura 8B) y fue comparable 0 y 4 horas después de la cromatografía CEX (Figuras 8B y 8C). Además, el porcentaje de especies de HMW en la MIVf de filtro en profundidad cargado disminuyó después de la cromatografía CEX, lo que confirma una disminución en las moléculas de anticuerpo parcial. Los resultados indicaron que la reoxidación de las especies de anticuerpo después de la filtración en profundidad cargada continuó en la columna CEX y alcanzó el estado estacionario.

### Ejemplo 7

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

Se lavó un filtro en profundidad cargado con agua desionizada para 100 l/m<sup>2</sup>, seguido por una fase de recirculación de 2 horas con una disolución 0,1 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para arrastrar el filtro y retirar los metales unidos, o con una disolución 100 mM de acetato, pH 5,0, como control. Una disolución acuosa que comprendía anticuerpo A se sometió a cromatografía en proteína A y luego una etapa de inactivación vírica seguida por una etapa de neutralización para formar una MIVn. Después de la recirculación de 2 horas, se añadieron disoluciones de acetato y sulfúrico a muestras de MIVn en diferentes relaciones de volumen de 0,5, 1, 2 y 4 partes de tampón a 1 parte de MIVn. La disolución de sulfúrico contuvo metales unidos y otro material arrastrado del filtro en profundidad cargado. Por ejemplo, la disolución de sulfúrico contuvo aproximadamente 1500 partes por billón (ppb) de Cu<sup>2+</sup>, mientras que la disolución de acetato comparada menos de 5 ppb de Cu<sup>2+</sup>. El nivel de reducción de anticuerpo parcial como el porcentaje de especies pre-pico en las muestras con adición se midió por ECnr-SDS 0, 2, 4 y 24 horas después de la adición. Como era de esperar, MIVn sin adición no presentó reoxidación de las moléculas de anticuerpo. A diferencia, el porcentaje de especies pre-pico en la MIVn añadida con la disolución de sulfúrico fue

significativamente menor (Figura 9A). El porcentaje de especies pre-pico en la MIVn añadida con la disolución de ácido sulfúrico a una concentración de 1x o superior alcanzó el estado estacionario a t=0, que indicó que el contacto de la MIVn con los componentes arrastrados del filtro en profundidad cargado potenció eficientemente la reoxidación. La adición a MIVn de la disolución de acetato no fue tan eficiente en facilitar la reoxidación de las moléculas de anticuerpo como la disolución de sulfúrico o el contacto directo de anticuerpo con el filtro en profundidad (Figura 9B). El porcentaje de especies pre-pico en la MIVn añadida con la disolución de acetato fue mayor a t=0 en comparación con la MIVn con adición de disolución de sulfúrico, y el estado estacionario no se alcanzó todavía después de un mantenimiento de 24 horas. Los resultados demostraron que los componentes obtenidos del filtro en profundidad cargado fueron capaces de potenciar eficientemente la reoxidación de moléculas de anticuerpo parcialmente reducidas.

**Ejemplo 8**

**Procesos de reoxidación de moléculas de anticuerpo reducidas**

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

**TABLA 1**

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

Primero, se obtienen disoluciones acuosas que comprendían moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, por ejemplo, HCCF, sin burbujear el cultivo celular fluido con aire. En el proceso A, por ejemplo, la disolución acuosa se somete a una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un primer filtrado, y el primer filtrado se somete a una etapa de cromatografía en proteína A para formar un primer eluido. El primer eluido se somete a una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un segundo filtrado, y el segundo filtrado se somete a una etapa de inactivación vírica a pH bajo para formar un segundo filtrado inactivado víricamente. El segundo filtrado inactivado víricamente se somete a una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un tercer filtrado. El tercer filtrado se somete a una etapa de cromatografía de intercambio catiónico para formar un segundo eluido, seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un cuarto filtrado. El cuarto filtrado se somete a una o más etapas de cromatografía adicional, por ejemplo, STIC PA, HIC y/o MMC, para formar un tercer (o cuarto o quinto) eluido, seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un quinto filtrado.

En otro ejemplo, para el proceso B, la disolución acuosa se somete a una etapa de cromatografía en proteína A para formar un primer eluido. El primer eluido se somete a una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un primer filtrado, y el primer filtrado se somete a una etapa de inactivación vírica a pH bajo para formar un primer filtrado inactivado víricamente. El primer filtrado inactivado víricamente se somete a una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un segundo filtrado. El segundo filtrado se somete a una etapa de cromatografía de intercambio catiónico para formar un segundo eluido, seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un tercer filtrado. El tercer filtrado se somete a una o más etapas de cromatografía adicional, por ejemplo, STIC PA, HIC y/o MMC, para formar un tercer (o cuarto o quinto) eluido, seguida por una etapa de filtración en profundidad cargada para formar un cuarto filtrado.

En cualquiera de los procesos A a N, el proceso opcionalmente adicional incluye etapas de purificación posteriores adicionales, por ejemplo, una o más etapas de ultrafiltración, diafiltración y filtración vírica, para lograr una disolución acuosa que comprende moléculas de anticuerpo reoxidadas. En cualquiera de los procesos A a N, la

disolución acuosa que comprende moléculas de anticuerpo reoxidadas lograda usando el proceso tiene un porcentaje reducido de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas, en comparación con el porcentaje de moléculas de proteína de unión al antígeno reducidas observado antes del inicio del proceso.

- 5 Los Ejemplos anteriores demuestran que poner en contacto una disolución acuosa que comprende moléculas de proteína de unión al antígeno con un filtro en profundidad cargado según la divulgación potencia eficazmente la reoxidación de moléculas de proteína de unión al antígeno parcialmente reducidas, restaurando así la integridad estructural y la función biológica y terapéutica relacionada de los anticuerpos.

10 **Listado de secuencias**

<110> Amgen, Inc.

<120> MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA DE UNIÓN AL ANTÍGENO

<130> 01017/49841A

<150> US 62/204.831

<151> 13-08-2015

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<223> Cadena pesada

<400> 1

ES 2 995 985 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly  
 100 105 110  
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala



ES 2 995 985 T3

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
435 440 445

Pro Gly Lys  
450

5 <210> 2  
<211> 213  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Polipéptido Sintético

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
<223> Cadena ligera

15 <400> 2

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

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

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr  
85 90 95

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

ES 2 995 985 T3

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

5 <210> 3  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <223> HC CDR1

15 <400> 3  
 Ser Tyr Asn Met  
 1

20 <210> 4  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <223> HC CDR2

30 <400> 4

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

35 Gly

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

ES 2 995 985 T3

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

5 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <223> HC CDR3

<400> 5

10 Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

20 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <223> LC CDR1

<400> 6

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His  
 1 5 10

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

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

35 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <223> LC CDR2

<400> 7

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 8  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC

55 <223> LC CDR3

<400> 8

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr  
 1 5

<210> 9

ES 2 995 985 T3

<211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 9

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

10 <210> 10  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

20 <400> 10

ES 2 995 985 T3

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

<210> 11  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

5

<400> 11

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

<210> 12  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

15

<400> 12

ES 2 995 985 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr  
85 90 95

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

**REIVINDICACIONES**

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

tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, vedolizumab y un medicamento biológico similar de cualquiera de los anteriores; o

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

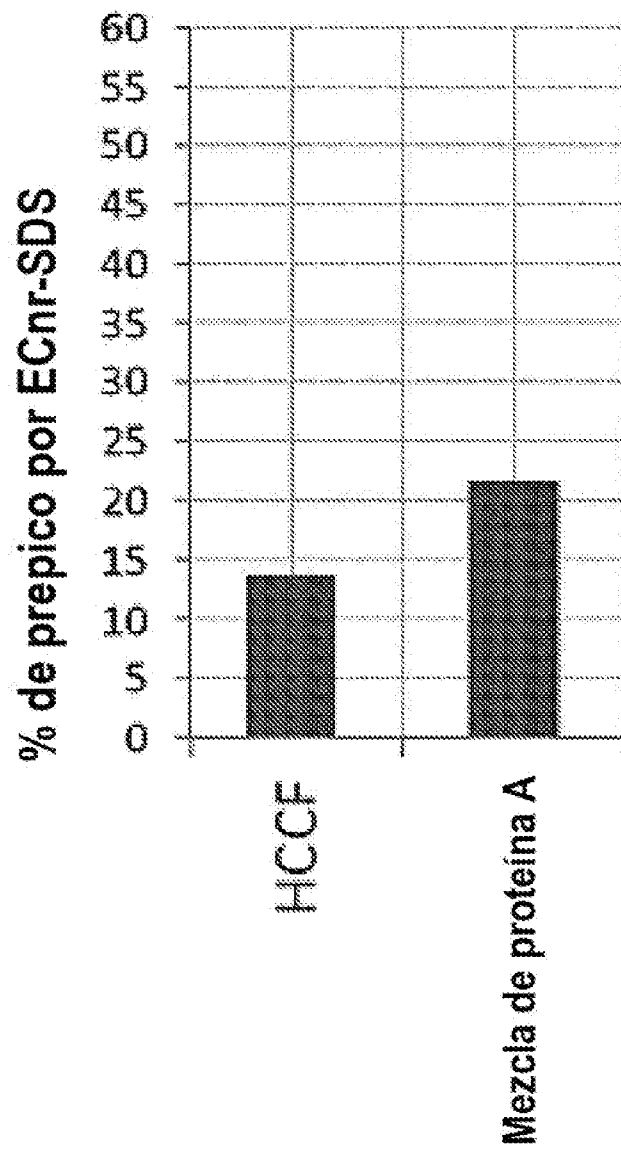


Figura 1

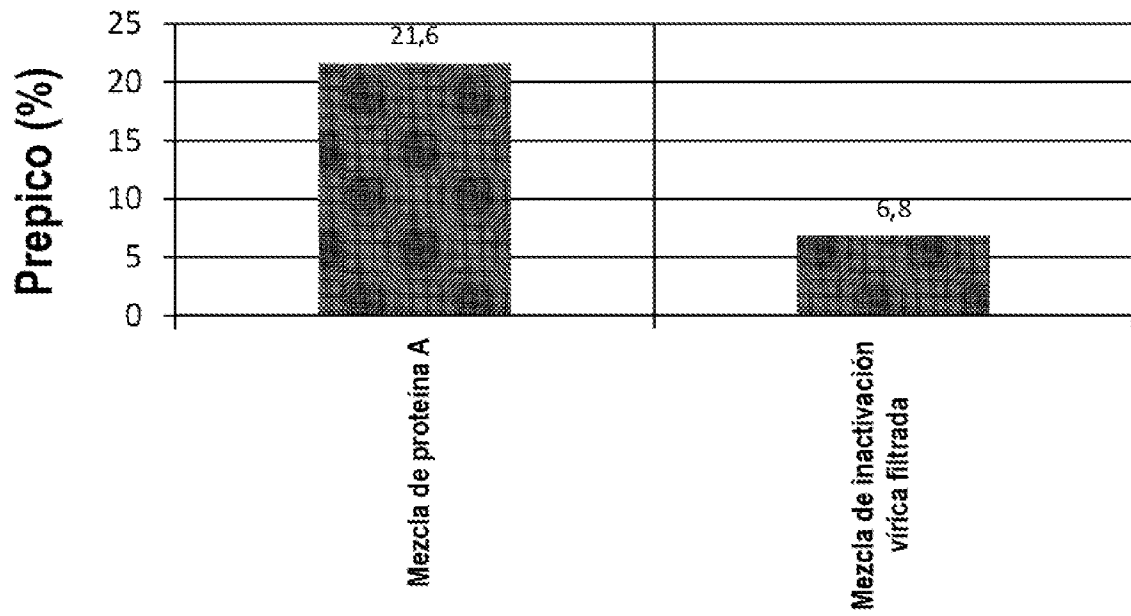


Figura 2

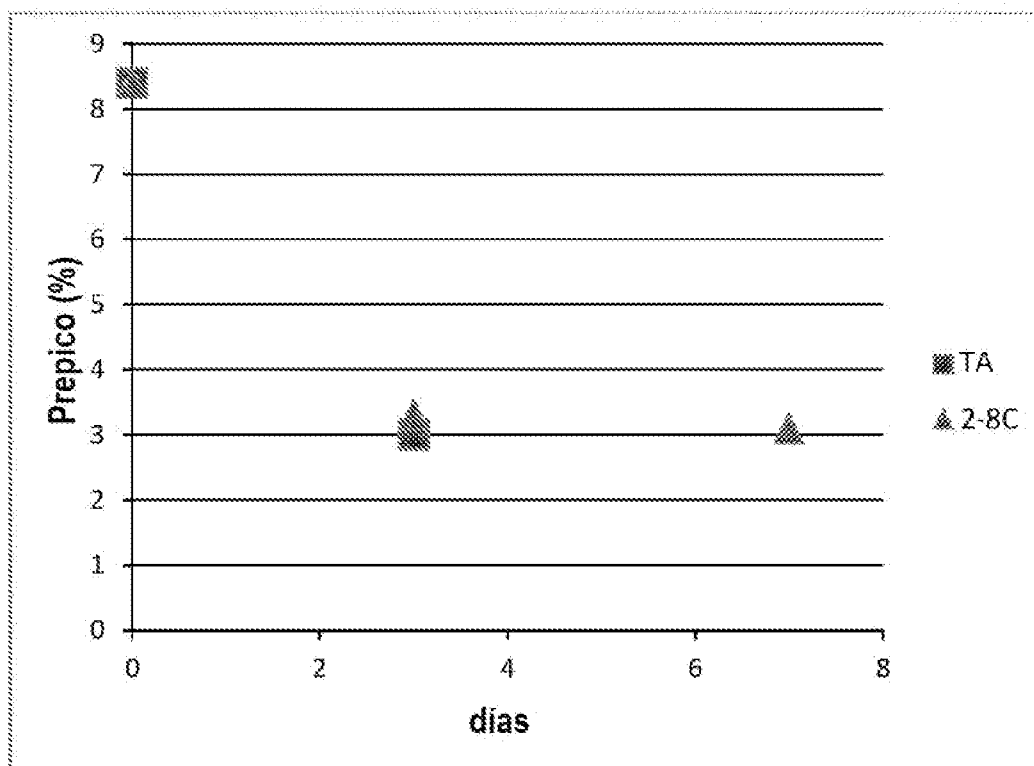


Figura 3A

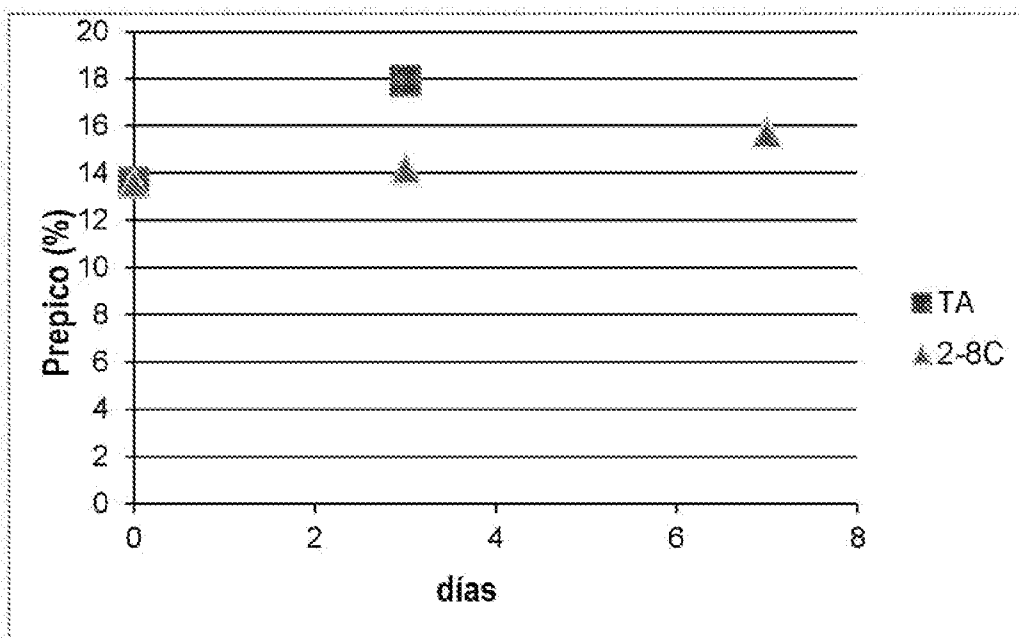
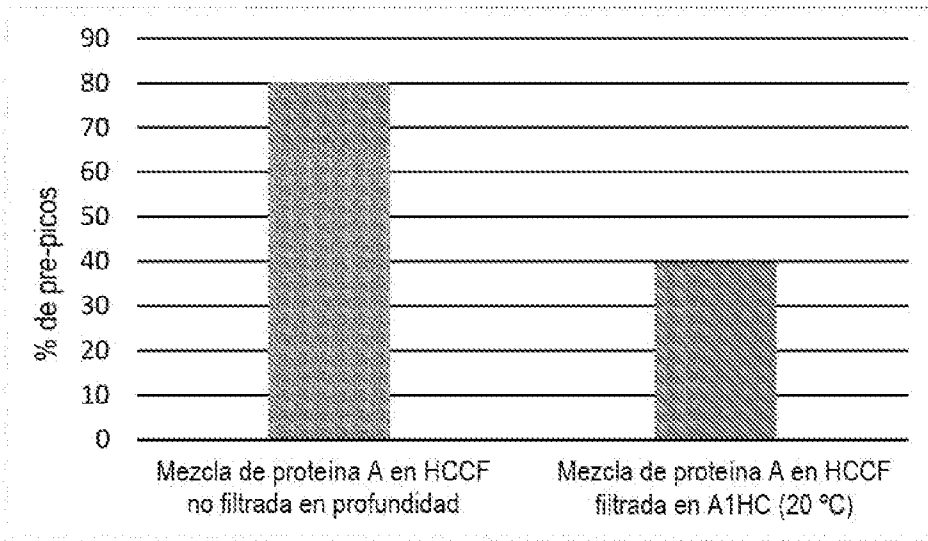
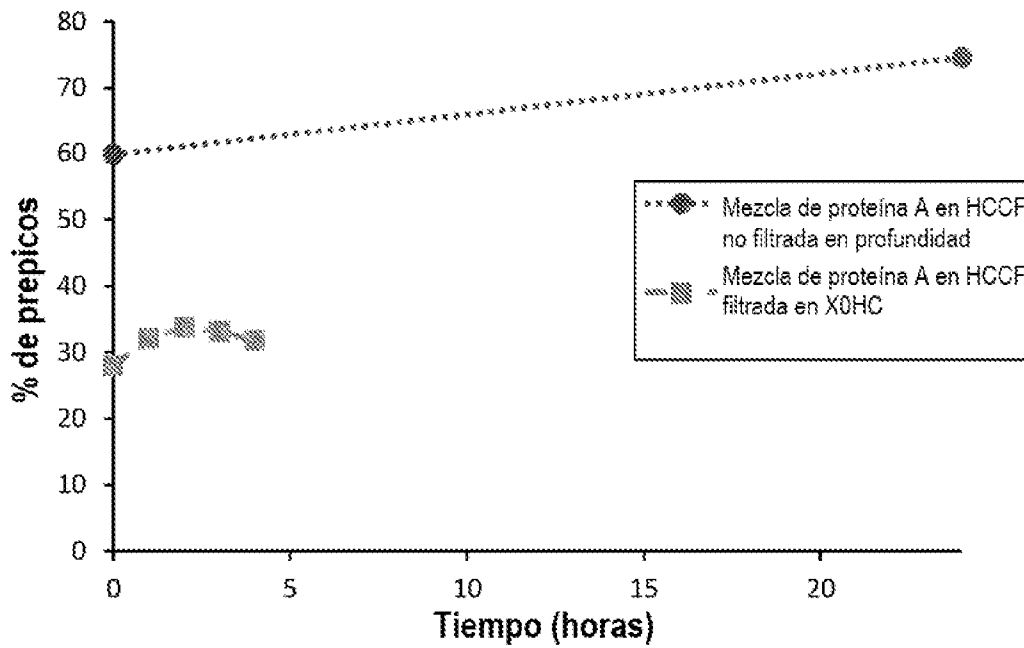


Figura 3B



**Figura 4A**



**Figura 4B**

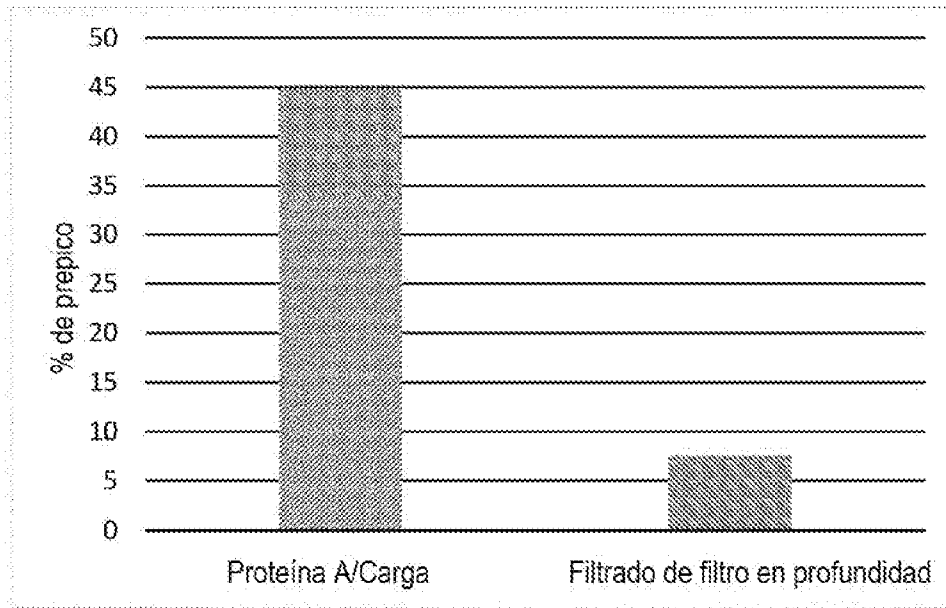


Figura 5A

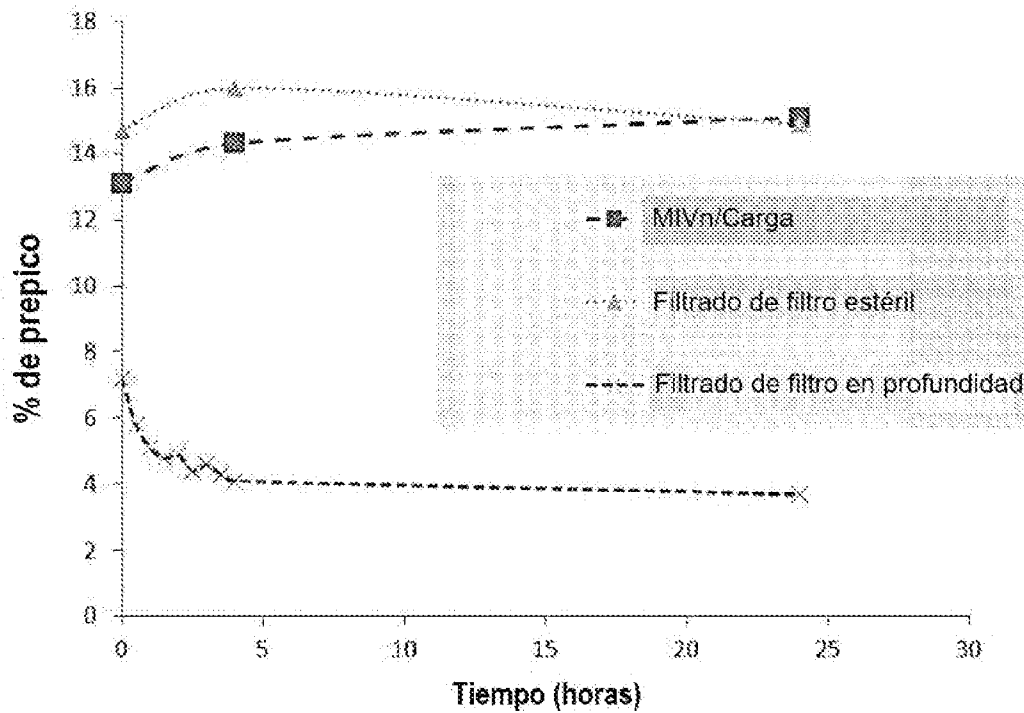


Figura 5B

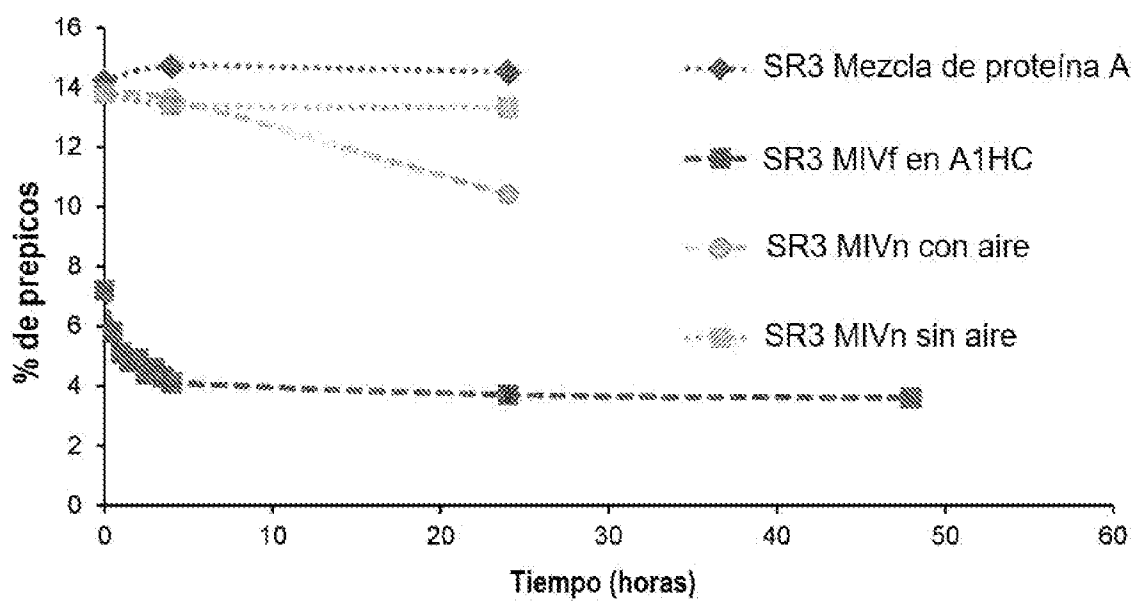


Figura 6

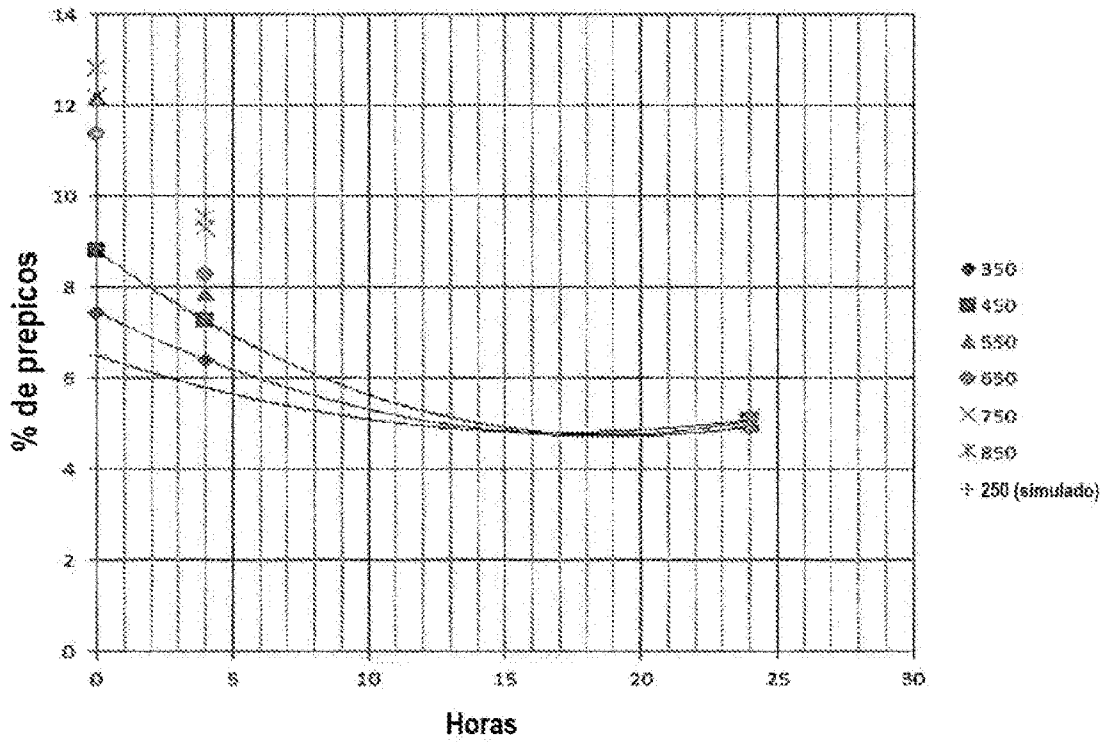


Figura 7A

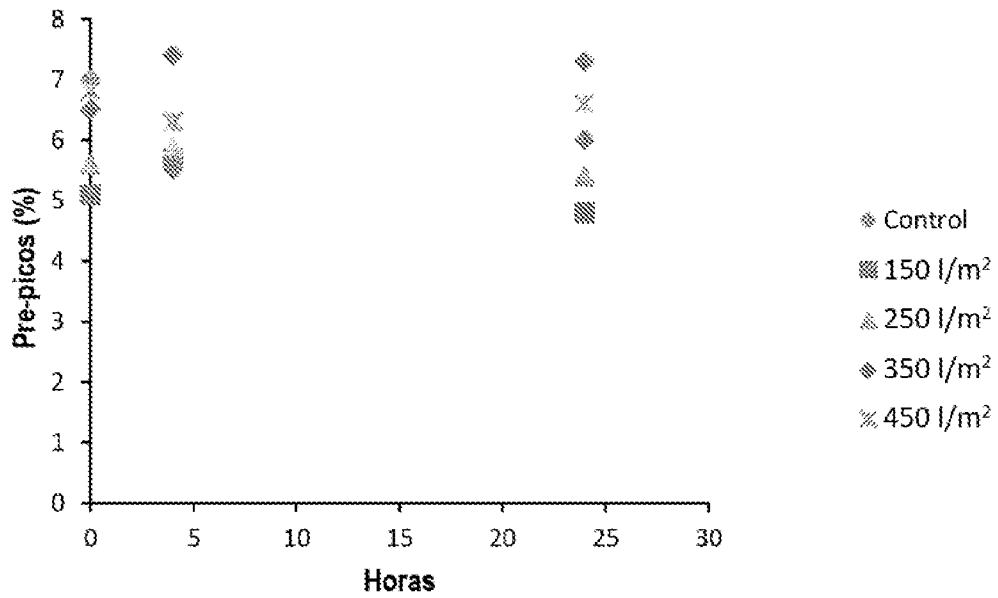


Figura 7B

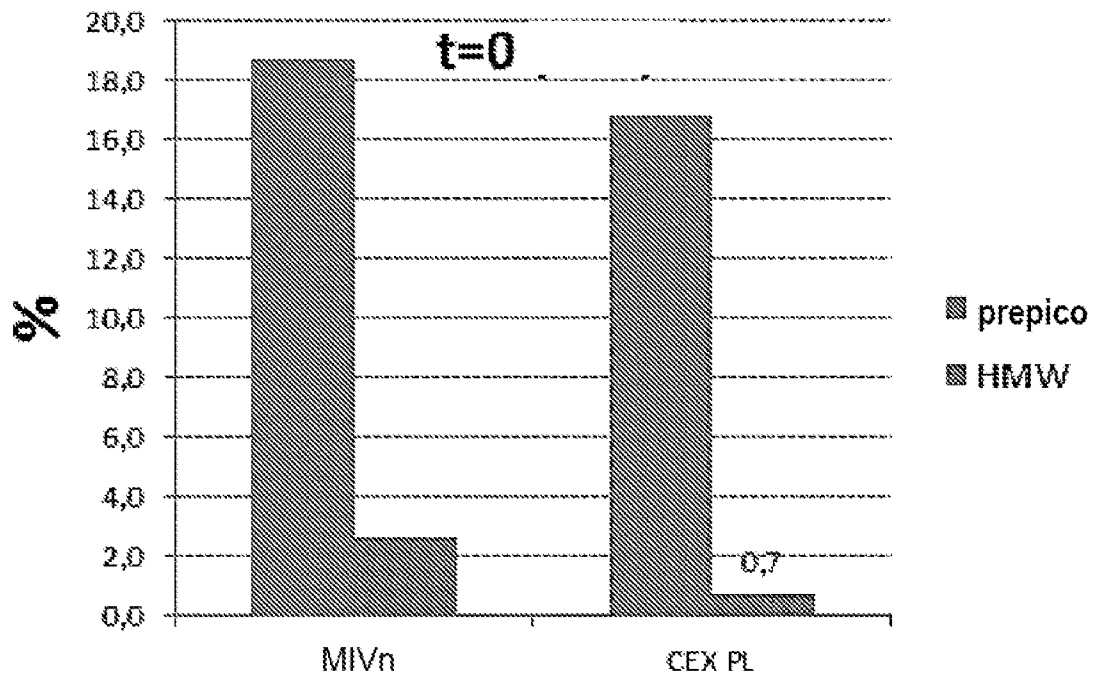


Figura 8A

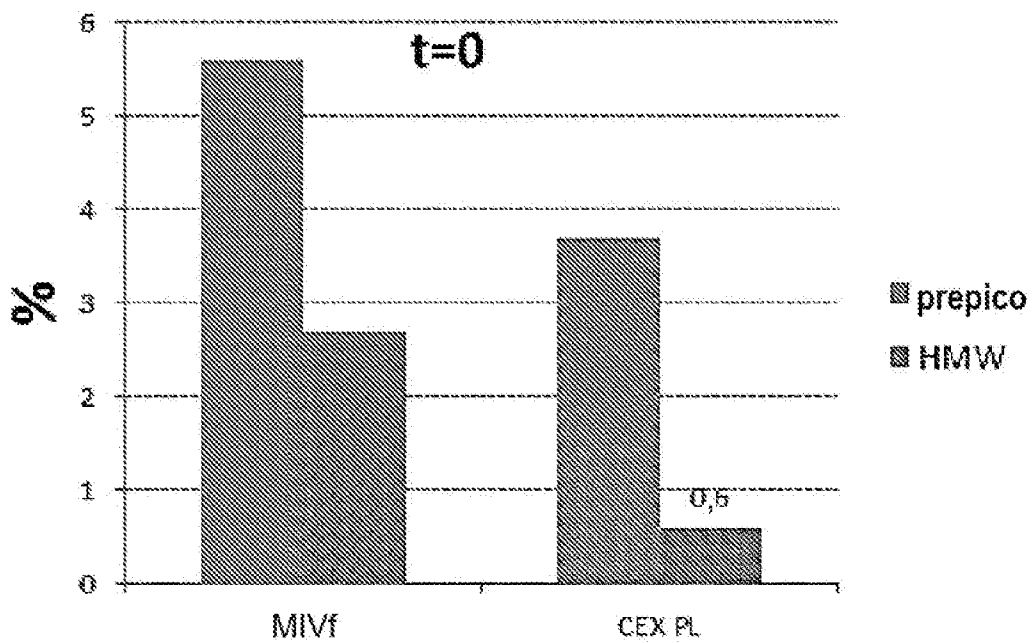


Figura 8B

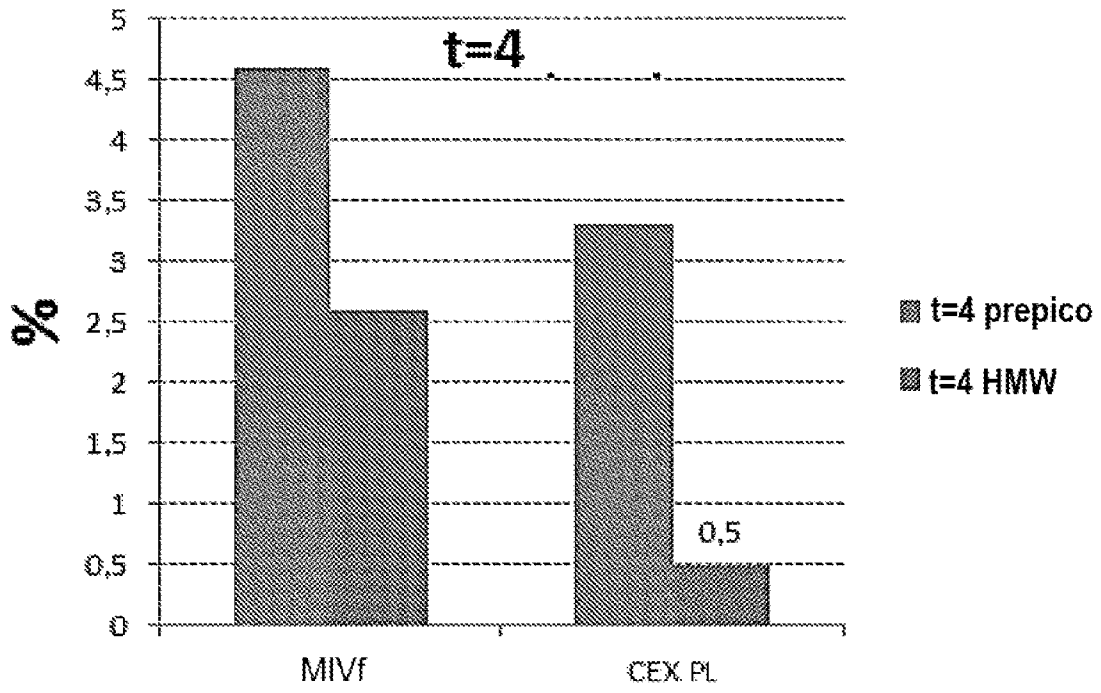


Figura 8C

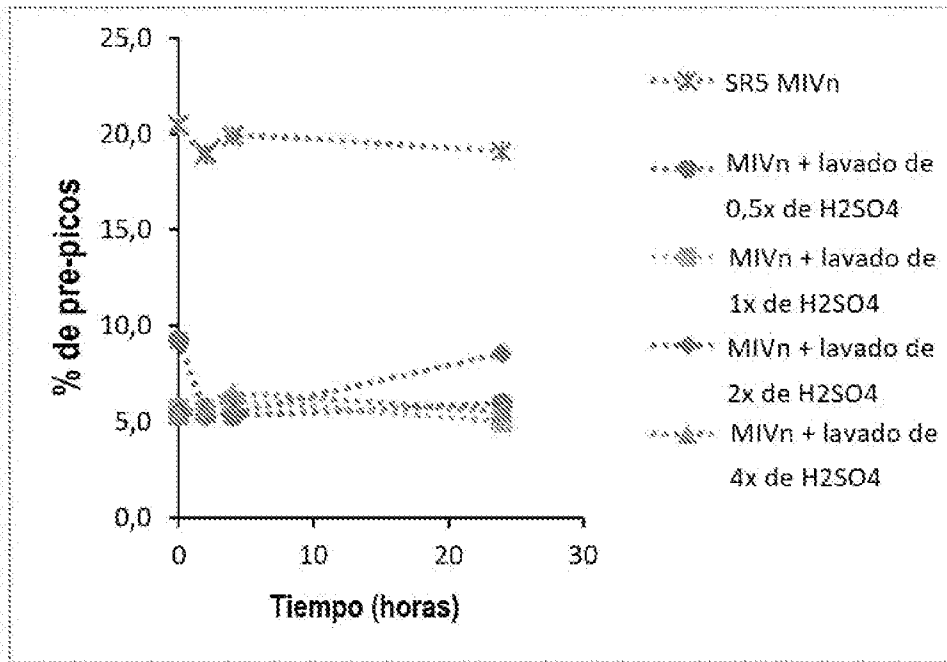


Figura 9A

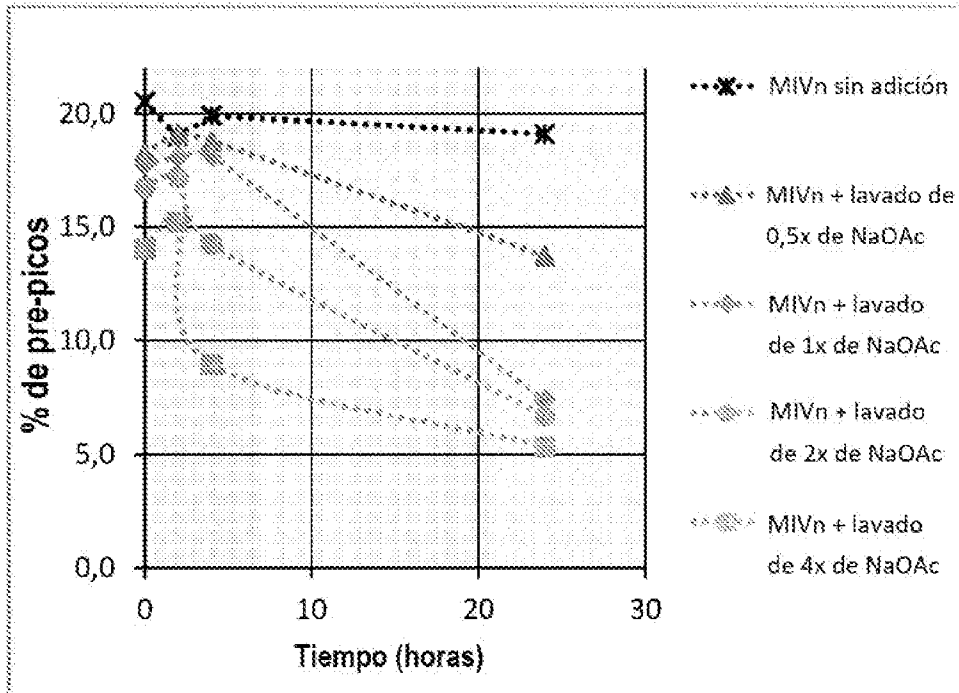


Figura 9B