(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 705 700**

(51) Int. CI.:

C07K 1/16 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)
B01D 15/36 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
G01N 30/86 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2014 PCT/US2014/046338**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15006686**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2014 E 14745049 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 3019516**

(54) Título: **Elucidación de la optimización de entrada en cromatografía de intercambio iónico**

(30) Prioridad:

12.07.2013 US 201361845890 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2019

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

MCDONALD, DANIEL;
PATAPOFF, THOMAS y
WANG, YAJUN

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

Elucidación de la optimización de entrada en cromatografía de intercambio iónico

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona procedimientos para analizar preparaciones de polipéptidos usando cromatografía de intercambio iónico con gradiente de fuerza iónica para variantes con carga de proteína.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las proteínas, como los anticuerpos monoclonales (mAb), tienen principalmente aminoácidos cargados y polares en la superficie en un entorno acuoso (Barlow, DJ y Thornton, JM (1986) *Biopolymers* 25:1717). Debido a la interacción molecular con los componentes en solución, los residuos en la superficie pueden sufrir múltiples modificaciones químicas y enzimáticas, lo que da lugar a una mezcla heterogénea de variantes de proteína con pequeñas diferencias en su superficie electrostática (Dick, LW *et al.*, (2009) *J. Chromatogr.* B 877:3841; Liu, HW *et al.*, (2008) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22:4081; Miller, AK, *et al.*, (2011) *J. Pharm. Sci.* 100:2543; Wang, WR *et al.*, (2011) *Mol. Immunol.* 48:860). Se considera que la cromatografía de intercambio catiónico (CEC) es el método de referencia para determinar el perfil de heterogeneidad de carga de los tratamientos con proteínas de acuerdo con una revisión reciente de Vlasak, J e Ionescu, R (2008 *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:468). El procedimiento de separación sensible a la carga se requiere típicamente por las agencias reguladoras para garantizar la consistencia de producción durante la fabricación y para monitorizar el nivel de degradación de los tratamientos con proteínas (Miller, AK, *et al.*, (2011) *J. Pharm. Sci.* 100:2543; He, XPZ (2009) *Electrophoresis* 30:714; Sosic, Z *et al.*, (2008) *Electrophoresis* 29:4368; Kim, J *et al.*, (2010) J. *Chromatogr*. B 878:1973: Teshima, G *et al.*, (2010) *J. Chromatogr*. A 1218:2091).

La cromatografía de intercambio iónico (IEC) se realiza típicamente en un modo de unión y elución. En general, se introduce una muestra de proteína, tal como un mAb, en la fase estacionaria en condiciones que faciliten la unión de la proteína a la columna (es decir, en un tampón A al 100 %). Se aplica un gradiente salino o de pH (es decir, un porcentaje en incremento de tampón B) para inducir proteínas cargadas diferentes para eluirse en orden. Los procedimientos de IEC son típicamente específicos de producto. El desarrollo de un procedimiento que sea tanto sólido, es decir, pueda soportar fluctuaciones de temperatura y pH, como que pueda determinar de forma suficiente la heterogeneidad de carga consume muchos recursos. Son deseables procedimientos para desarrollar un sistema tampón óptimo que permita el desarrollo de ensayos sólidos para determinar la presencia de contaminantes en múltiples productos de polipéptido.

Kelley *et al.* (*Biotechn. and Bioengin.*, (2008) 100(5): 950-963) divulgan el uso de un sistema de cribado de alto rendimiento para optimizar las etapas de cromatografía de intercambio iónico. En un estudio de cribado, se sometieron a prueba 11 resinas, 4 niveles de pH y 3 concentraciones de sal iniciales (144 combinaciones en total). Ahamed *et al*. (*J. Chromatogr.* A, (2007), 1164: 181-188) divulgan un procedimiento para cribar manualmente el pH óptimo usando una cromatografía de intercambio iónico con gradiente de pH y representando los valores de pH obtenidos frente a las cargas netas de proteínas para obtener los valores de pI teóricos.

La presente invención proporciona procedimientos para predecir las condiciones óptimas para el intercambio iónico en base a modelos matemáticos tanto del polipéptido como del sistema de tamponamiento.

BREVE SUMARIO

La materia objeto de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos para identificar una condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima para analizar una pluralidad de composiciones, en los que cada composición comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, comprendiendo el procedimiento a) representar una curva de carga neta frente al pH en una temperatura seleccionada basada en la composición de aminoácidos de los polipéptidos de dos o más de las composiciones y b) determinar el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH en o cerca de pH neutro determinando la segunda derivada de las representaciones de la etapa a); en los que la condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima es un pH en aproximadamente un punto de inflexión común para los polipéptidos de una o más de las composiciones. En algunos modos de realización, los procedimientos comprenden además c) determinar el cambio en el pH en el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH con un cambio en la temperatura (dPI/dT) para los polipéptidos de dos o más de las composiciones, d) seleccionar un tampón para su uso en cromatografía, en los que un cambio en la constante de disociación ácida del tampón con un cambio en la temperatura (dpKa/dT) es esencialmente el mismo que el dPI/dT de los polipéptidos.

En otros aspectos, la invención proporciona un procedimiento para identificar una condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima para analizar una composición que comprende un polipéptido y uno o

más contaminantes, comprendiendo el procedimiento a) representar una curva de carga neta frente al pH en una temperatura seleccionada basada en la composición de aminoácidos del polipéptido y b) determinar el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH en o cerca de pH neutro determinando la segunda derivada de las representaciones de la etapa a); en el que la condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima es un pH en aproximadamente el punto de inflexión para el polipéptido.

En algunos modos de realización, si la carga neta en el punto de inflexión es positiva, se usa un material de intercambio catiónico para la cromatografía de intercambio iónico. En algún modo de realización, el material de cromatografía de intercambio catiónico es un material de cromatografía sulfonado o un material de cromatografía carboxilado. En otros modos de realización, si la carga neta en el punto de inflexión es negativa, se usa un material de intercambio aniónico para la cromatografía. En algunos modos de realización, el material de cromatografía de intercambio aniónico es un material de cromatografía de amina cuaternaria o un material de cromatografía de amina terciaria. Aún en otros modos de realización, se usa un material de cromatografía en modo mixto para la cromatografía. En algunos modos de realización, el material de intercambio iónico en modo mixto es una mezcla de material de cromatografía sulfonado o material de cromatografía carboxilado rellenado secuencialmente y un material de cromatografía de amina cuaternaria o material de cromatografía de amina terciaria.

En algunos modos de realización, el tampón proporciona una capacidad tamponadora eficaz en el pH en el punto de inflexión. En algunos modos de realización, el dPI/dT de los polipéptidos de una o más de las composiciones es de aproximadamente -0,02 unidades de pH. En algunos modos de realización, el cambio en la temperatura es de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 70 ºC. En otros modos de realización, el cambio en la temperatura es de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 50 ºC. En algunos modos de realización, dpKa/dT = dPI/dT ± 50 %. En algunos modos de realización, la carga neta del polipéptido en el tampón seleccionado en la etapa d) cambia en menos de 0,5 por encima de 30 °C. En algunos modos de realización, se usa el tampón seleccionado en la etapa d) en cromatografía a una concentración que varía de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 250 mM.

En algunos modos de realización de los modos de realización anteriores, las composiciones tampón comprenden además una sal. En otros modos de realización, la sal es NaCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$ o Na_2SO_4. En algunos modos de realización, la concentración de la sal varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1 M.

En algunos modos de realización de los procedimientos de la invención, el polipéptido es un anticuerpo o inmunoadhesina o fragmento de los mismos. En algunos modos de realización, el polipéptido es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otros modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Aún en otros modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

En algunos modos de realización de los procedimientos de la invención, el contaminante es una variante del polipéptido. En algunos modos de realización, el contaminante es un producto de degradación del polipéptido. En algunos modos de realización, el contaminante es una variante con carga del polipéptido.

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos para analizar una composición, en los que la composición comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, en los que el procedimiento separa eficazmente los polipéptidos de los contaminantes, comprendiendo el procedimiento a) determinar las condiciones de pH y temperatura de separación por intercambio iónico óptimas para una pluralidad de composiciones, comprendiendo cada composición un polipéptido diana y uno o más contaminantes de acuerdo con los procedimientos de la invención, b) unir el polipéptido y uno o más contaminantes de la composición a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga, en los que el tampón de carga comprende un tampón identificado mediante el procedimiento de la invención; c) eluir el polipéptido y uno o más contaminantes del material de cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente de un tampón de elución, en los que el tampón de elución comprende el tampón y una sal, en los que se incrementa la concentración de la sal en un gradiente con el tiempo, en los que el polipéptido y el uno o más contaminantes se separan mediante el gradiente; y d) detectar el polipéptido y el uno o más contaminantes.

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos para analizar una composición que comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, en los que el procedimiento separa eficazmente el polipéptido de los contaminantes, comprendiendo el procedimiento a) unir el polipéptido y uno o más contaminantes a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga, en los que el tampón de carga comprende un tampón, y en los que se han optimizado el pH y la temperatura de la cromatografía para una pluralidad de polipéptidos diana i) representando una curva de carga neta frente al pH en una temperatura seleccionada, en los que la curva se basa en la composición de aminoácidos del polipéptido de dos o más polipéptidos diana, y ii) determinar el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH determinando la segunda derivada de las representaciones de la etapa i); en los que la condición de cromatografía de intercambio iónico óptima es un pH en un punto de inflexión común para dos o más polipéptidos diana; b) eluir el polipéptido y uno o más contaminantes del material de cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente de un tampón de elución, en los que el tampón de elución comprende el tampón y una sal, en los que el polipéptido y el uno o más contaminantes se separan

mediante el gradiente; y c) detectar el polipéptido y el uno o más contaminantes. En algunos modos de realización, la temperatura seleccionada es la temperatura ambiente. En algunos modos de realización, se identifica el tampón a) determinando el cambio en el pH en el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH con un cambio en la temperatura (dPI/dT) para los dos o más polipéptidos diana, b) seleccionando un tampón para el que un cambio en la constante de disociación ácida del tampón con un cambio en la temperatura (dpKa/dT) es esencialmente el mismo que el dPI/dT del uno o más polipéptidos diana con puntos de inflexión comunes. En algunos modos de realización, el tampón proporciona una capacidad tamponadora eficaz en el pH en el punto de inflexión.

En el presente documento se divulgan procedimientos para analizar una composición que comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, en los que el procedimiento separa eficazmente el polipéptido de los contaminantes, comprendiendo el procedimiento a) unir el polipéptido y uno o más contaminantes a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga, en los que el tampón de carga comprende un tampón, y en los que se han optimizado el pH y la temperatura de la cromatografía para una pluralidad de polipéptidos diana; b) eluir el polipéptido y uno o más contaminantes del material de cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente de un tampón de elución, en los que el tampón de elución comprende el tampón y una sal, en los que el polipéptido y el uno o más contaminantes se separan mediante el gradiente; y c) detectar el polipéptido y el uno o más contaminantes. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón es ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES) o ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES). En otros aspectos de la divulgación, la concentración del tampón varía de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM. En algunos modos de realización, el cambio en la temperatura es de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 70 ºC. En otros aspectos de la divulgación, el cambio en la temperatura es de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 50 ºC. En algunos modos de realización, dpKa/dT = dPI/dT ± 50 %. En algunos aspectos de la divulgación, la carga neta del polipéptido en el tampón cambia en menos de 0,5 por encima de 30 ºC. En algunos modos de realización, se usa el tampón en cromatografía a una concentración que varía de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 250 mM.

En algunos modos de realización de los modos de realización anteriores, las composiciones tampón comprenden además una sal. En otros modos de realización, la sal es NaCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$ o Na_2SO_4. En algunos modos de realización, la concentración de la sal varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1 M. En algunos modos de realización, la concentración de sal se incrementa de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 100 mM en aproximadamente 100 minutos. En otros modos de realización, la concentración de sal se incrementa de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 80 mM en aproximadamente 40 minutos.

En algunos modos de realización de los procedimientos de la invención, el polipéptido es un anticuerpo o inmunoadhesina o fragmento de los mismos. En algunos modos de realización, el polipéptido es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otros modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Aún en otros modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

En algunos modos de realización de los procedimientos de la invención, el contaminante es una variante del polipéptido. En algunos modos de realización, el contaminante es un producto de degradación del polipéptido. En algunos modos de realización, el contaminante es una variante con carga del polipéptido.

En algunos modos de realización, el material de cromatografía es un material de cromatografía de intercambio catiónico. En otros modos de realización, el material de cromatografía de intercambio catiónico es un material de cromatografía sulfonado o un material de cromatografía carboxilado.

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos para analizar una pluralidad de composiciones de polipéptido, en los que cada composición de polipéptido comprende un polipéptido y una o más variantes con carga del polipéptido, en los que el procedimiento separa eficazmente el polipéptido de sus variantes con carga; para cada composición de polipéptido el procedimiento comprende, a) unir el polipéptido y una o más variantes con carga a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga a un caudal de aproximadamente 1 ml/minuto, en los que el tampón de carga comprende un tampón HEPES 10 mM a aproximadamente pH 7,6 a aproximadamente 40 ºC; b) eluir el polipéptido y las variantes con carga contaminantes del material de cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente de un tampón de elución, en los que el tampón de elución comprende aproximadamente tampón HEPES 10 mM a aproximadamente pH 7,6 y NaCl, en los que la concentración del NaCl se incrementa en el gradiente de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 80 mM en aproximadamente 40 minutos, en los que el polipéptido y sus variantes con carga se separan mediante el gradiente; y c) detectar el polipéptido y la una o más variantes con carga. En algunos modos de realización, la pluralidad de composiciones de polipéptido comprende polipéptidos diferentes. En algunos modos de realización, la pluralidad de composiciones de polipéptido comprende polipéptidos con pI diferentes. En algunos modos de realización, las composiciones de polipéptido son composiciones de anticuerpo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un gráfico que representa la carga neta calculada frente al pH para el anticuerpo monoclonal mAb1 (línea de blanco continua) y sus dos variantes con carga. Las líneas discontinuas representan una variante ácida con dos cargas negativas y una variante básica con dos cargas positivas como se indica. Las curvas se crearon usando la composición de la secuencia de aminoácidos de mAb1 y sus variantes. La estrella indica el punto de inflexión de la curva. Un procedimiento de IEC con plataforma ejecutado al pH en el punto de inflexión proporcionará una resolución y solidez óptimas con respecto al pH.

La figura 2A muestra un gráfico del porcentaje de histidinas protonadas (cargadas positivamente) en una población (por ejemplo, una solución de polipéptido) en la escala de pH.

La figura 2B muestra el número de histidinas desprotonadas (frecuencia de carga) en un polipéptido que contiene diez residuos de histidina a pH 6,5 y pH 7,5. Muestra que en el punto de inflexión (pH 7,5), la mayoría de los residuos de histidina están desprotonados y no cargados.

La figura 2C muestra un ejemplo de cuatro moléculas de polipéptido, cada una con dos residuos de histidina. En la pKa de His (pH 6,0), un 50 % de los residuos de His están protonados y un 50 % están desprotonados. La combinación del estado de carga de los residuos de His en estas cuatro moléculas es una distribución binomial en la pKa: una con ambas His protonadas; dos con una His protonada y otra desprotonada; y una con ambas His desprotonadas.

La figura 3 es un gráfico de un anticuerpo monoclonal típico en relación con la frecuencia de carga de los aminoácidos polares como una función del pH. La probabilidad del estado de carga más abundante a pH diferentes para seis aminoácidos que contribuyen al cálculo de la carga a 37 °C se representa como líneas continuas, y la combinación ponderada de estos residuos de aminoácido para mAb1 se representa como una línea discontinua.

La figura 4 muestra la entropía de Shannon de mAb1 a pH diferentes a 22 °C. El tipo y el número de residuos de aminoácido que contribuyeron al cálculo de la carga neta se enumeran en la tabla 3.

La figura 5 muestra la vista en 3D de la distribución de carga y la frecuencia de distribución de carga en una población de mAb1 a pH diferentes a 37 °C. Muestra que en el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH, la distribución de carga es la más homogénea con una frecuencia de aproximadamente 0,7; mientras que a pH lejos del punto de inflexión, la distribución de carga es más amplia con una frecuencia de 0,15. Puesto que la separación por IEC se basa en la carga, cuanto más alta sea la frecuencia de distribución de carga, más estrecho será el pico y más alta la resolución.

La figura 6 es la ilustración en 2D de la figura 5, una curva de carga neta frente al pH para mAb1. El punto de inflexión es a pH 7,5, cuando la temperatura es de 37 °C.

La figura 7 es un gráfico que muestra la carga neta como una función del pH para una serie de productos de mAb a 37 °C. Se calculó la carga neta calculada de cada mAb basada en la secuencia de aminoácidos del mAb. Algunos mAb tenían diferentes secuencias de aminoácidos de la región estructural. El punto de inflexión de todas las curvas es alrededor de pH 7,5 a 37 °C.

La figura 8 es un gráfico que muestra los puntos de inflexión calculados para una serie de productos de mAb a 22 °C (rombos), 37 °C (triángulos) y 50 °C (cuadrados).

La figura 9 es un gráfico que muestra la relación de la carga neta con respecto al pH para mAb2 en temperaturas que varían de 22 °C a 50 °C.

La figura 10A muestra la tasa de cambio en los puntos de inflexión. La figura 10B muestra el cambio en el dPI como una función de la temperatura para los mAb seleccionados. La tasa de cambio es prácticamente idéntica.

La figura 11 es un gráfico que muestra la carga neta para un mAb2 como una función de la temperatura en un tampón dado (fosfato, HEPES, ACES y Tris).

La figura 12 muestra los cromatogramas superpuestos de una serie de mAb con pI diferentes usando el mismo procedimiento de cromatografía. El tampón A fue ACES 5 mM, pH 7,5 a 37 ºC. El tampón B fue NaCl 180 mM en tampón A. El gradiente salino fue NaCl 0 mM a NaCl 100 mM en 100 minutos o 1 mM/min a 37 ºC. El caudal fue de 0,8 ml/min. La columna fue una columna MabPac SCX-10 (4×250 mm).

La figura 13 muestra la solidez de una IEC para mAb4 como una función del pH. Las condiciones de cromatografía son como en la figura 12, excepto porque el gradiente fue NaCl 1,5 mM/min.

La figura 14 muestra la solidez de una IEC para tres mAb como una función de la temperatura. Las condiciones de cromatografía fueron las mismas para los tres anticuerpos y como se describe para la figura 13.

La figura 15 muestra la solidez de una IEC para tres mAb como una función de la temperatura. Las condiciones de cromatografía fueron las mismas para los tres anticuerpos. Las condiciones de cromatografía son como en la figura 13, excepto porque el tampón fue HEPES 10 mM.

La figura 16 muestra gráficos que comparan la cromatografía IEX de tres mAb usando el procedimiento de múltiples productos y usando procedimientos desarrollados para cada mAb. El procedimiento de múltiples productos fue ACES 5 mM, pH 7,5, a 37 °C con un gradiente de NaCl 0 mM a NaCl 75 mM en 50 minutos (1,5 mM/min) y un caudal de 0,8 ml/min. El tampón y la temperatura para los procedimientos específicos de producto fueron diferentes. Para mAb8, fue MES 20 mM, pH 6,5 a 30 ºC; para mAb25, fue HEPES 20 mM, pH 7,6 a 42 ºC; y para mAb26 fue ACES 20 mM, pH 7,1 a 40 °C. La columna fue una columna MabPac SCX-10 (4×250 mm).

La figura 17 muestra el uso de las condiciones de cromatografía de múltiples productos usando mAb8 en cuatro columnas de cromatografía diferentes; ProPac WCX-10 (10 µm, 4×250 mm), YMC (5 µm, 4×100 mm), AntiBodix (5 µm, 4×250 mm) y MabPac SCX-10 (10 µm, 4×250 mm). Las condiciones de cromatografía fueron como se describe para la figura 13. El aumento muestra la ampliación de picos de variante.

La figura 18 muestra el uso de las condiciones de cromatografía de múltiples productos usando mAb8 en columnas de cromatografía ProPac WCX-10 de tamaños diferentes; 4×250 mm, 4×100 mm, 4×50 mm. Los tiempos de desarrollo fueron más cortos con columnas más cortas. Los cromatogramas se normalizan para el pico principal. Las condiciones de cromatografía fueron como se describe para la figura 15, excepto por el tiempo de gradiente.

La figura 19 muestra un gráfico del porcentaje relativo de pico principal de un estudio de DOE en cuanto a la solidez en BPF.

La figura 20 muestra un gráfico del porcentaje relativo de pico principal de un estudio de DOE en cuanto a la solidez en BPF.

La figura 21 muestra un gráfico del porcentaje relativo de pico principal de un estudio de DOE en cuanto a la solidez en BPF.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona procedimientos para identificar una condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima para analizar una composición que comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, comprendiendo el procedimiento a) representar una curva de carga neta frente al pH en una temperatura seleccionada basada en la composición de aminoácidos del polipéptido y b) determinar el punto de inflexión (PI) de la curva de carga neta frente al pH en o cerca de pH neutro determinando la segunda derivada de las representaciones de la etapa a); en el que la condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima es un pH en aproximadamente el punto de inflexión para el polipéptido. En algunos modos de realización, se determina la distribución de la frecuencia de carga calculando la entropía de Shannon del polipéptido a valores de pH diferentes para una temperatura dada. A medida que disminuye la entropía de Shannon, la distribución de carga del polipéptido en una composición se vuelve más homogénea. Como resultado, se mejora la capacidad de separar el polipéptido y sus variantes con carga.

En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para identificar un tampón para su uso en una condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima para analizar una composición que comprende un polipéptido y uno o más contaminantes. En algunos modos de realización, se selecciona un tampón donde el cambio en la constante de disociación ácida con la temperatura (dpKa/dT) es aproximadamente igual al cambio en el punto de inflexión como se describe anteriormente con la temperatura (dPI/dT).

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos para identificar una condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima para analizar una pluralidad de composiciones, en los que cada composición comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, comprendiendo el procedimiento a) representar una curva de carga neta frente al pH en una temperatura seleccionada basada en la composición de aminoácidos de los polipéptidos de dos o más de las composiciones y b) determinar el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH en o cerca de pH neutro determinando la segunda derivada de las representaciones de la etapa a); en los que la condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima es un pH en aproximadamente un punto de inflexión común para los polipéptidos de una o más de las composiciones. Como tal, se puede usar el procedimiento para analizar múltiples productos sin la necesidad de desarrollar protocolos específicos para cada producto.

I. Definiciones

El término “polipéptido” o “proteína” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y se puede interrumpir por moléculas distintas a aminoácidos. Los términos también engloban un

polímero de aminoácidos que se ha modificado naturalmente o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje o toxina. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los términos “polipéptido” y “proteína” como se usa en el presente documento engloban específicamente anticuerpos.

El término “variante con carga de polipéptido” como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que se ha modificado desde su estado natural de tal manera que se altere la carga del polipéptido. En algunos ejemplos, las variantes con carga son más ácidas que el polipéptido original; es decir, tienen un pI más bajo que el polipéptido original. En otros ejemplos, las variantes con carga son más básicas que el polipéptido original; es decir, tienen un pI más alto que el polipéptido original. Dichas modificaciones se pueden diseñar o ser el resultado de procesos naturales, tales como oxidación, desamidación, procesamiento C terminal de residuos de lisina, formación de piroglutamato N terminal y glucación. En algunos ejemplos, una variante con carga de polipéptido es una glucoproteína donde se modifica el glucano acoplado a la proteína de tal manera que se altere la carga de la glucoproteína en comparación con la glucoproteína original, por ejemplo, mediante adición de ácido siálico o sus derivados. Una “variante con carga de anticuerpo” como se usa en el presente documento es un anticuerpo o fragmento del mismo en la que se ha modificado el anticuerpo o fragmento del mismo desde su estado natural de tal manera que se altere la carga del anticuerpo o fragmento del mismo.

Polipéptido “purificado” (por ejemplo, anticuerpo o inmunoadhesina) significa que el polipéptido se ha incrementado en pureza, de tal manera que exista en una forma que sea más pura de la que existe en su entorno natural y/o cuando inicialmente se sintetiza y/o amplifica en condiciones de laboratorio. La pureza es un término relativo y no significa necesariamente pureza absoluta.

El término “antagonista” se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido natural. De una manera similar, el término “agonista” se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido natural. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpo agonistas o antagonistas, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos naturales, etc. Los procedimientos para identificar los agonistas o antagonistas de un polipéptido pueden comprender poner en contacto un polipéptido con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas asociadas normalmente con el polipéptido.

Un polipéptido “que se une a” un antígeno de interés, por ejemplo, una diana de antígeno polipeptídico asociado a tumor, es uno que se une al antígeno con afinidad suficiente, de tal manera que el polipéptido sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en la selección como diana de una célula o tejido que exprese el antígeno, y significativamente no reacciona de forma cruzada con otros polipéptidos. En dichos modos de realización, el grado de unión del polipéptido a un polipéptido “no diana” será de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del polipéptido a su polipéptido diana particular, como se determina mediante análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA).

Con respecto a la unión de un polipéptido a una molécula diana, el término “unión específica a” o “se une específicamente a” o “específico para” un polipéptido particular o un epítopo en una diana polipeptídica particular significa que la unión es diferente de forma mensurable de una interacción no específica. Se puede medir la unión específica, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que, en general, es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, se puede determinar la unión específica mediante competencia con una molécula de control que sea similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, se indica la unión específica si la unión de la diana marcada con respecto a una sonda se inhibe de forma competitiva mediante la diana no marcada en exceso.

El término “anticuerpo” en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada. El término “inmunoglobulina” (Ig) se usa de manera intercambiable con anticuerpo en el presente documento.

Los anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina naturales que tienen estructuras variables, todas basadas en el plegamiento de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos IgG tienen dos cadenas “pesadas” y dos cadenas “ligeras” que se unen por enlaces disulfuro para formar un anticuerpo funcional. Cada cadena pesada y ligera comprende por sí misma una región “constante” (C) y una región “variable” (V). Las regiones V determinan la especificidad de unión a antígeno del anticuerpo, mientras que las regiones C proporcionan soporte y función estructurales en las interacciones no específicas de antígeno con efectores inmunitarios. La especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo es la capacidad de un anticuerpo de unirse específicamente a un antígeno particular.

La especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo se determina por las características estructurales de la región V. La variabilidad no se distribuye uniformemente en el tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables llamados regiones estructurales (FR) de 15-30 aminoácidos separados mediante regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas “regiones hipervariables” (HVR) que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β, conectadas mediante tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Cada región V comprende típicamente tres HVR, por ejemplo, regiones determinantes de la complementariedad (“CDR”, cada una de las cuales contiene un “bucle hipervariable”) y cuatro regiones estructurales. Un sitio de unión de anticuerpo, la unidad estructural mínima requerida para unirse con afinidad sustancial a un antígeno deseado particular, por lo tanto, incluirá típicamente las tres CDR y al menos tres, preferentemente cuatro, regiones estructurales intercaladas entre ellas para mantener y presentar las CDR en la conformación apropiada. Los anticuerpos de cuatro cadenas clásicos tienen sitios de unión a antígeno que se definen por los dominios V_H y V_L en cooperación. Determinados anticuerpos, tales como los anticuerpos de camello y de tiburón, carecen de cadenas ligeras y se basan en sitios de unión formados solo por cadenas pesadas. Se pueden preparar inmunoglobulinas genomanipuladas de dominio único en las que los sitios de unión se forman por cadenas pesadas o cadenas ligeras solas, en ausencia de cooperación entre V_H y V_L.

El término “variable” se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β, conectadas mediante tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término “región hipervariable” (HVR), cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable puede comprender residuos de aminoácido de una “región determinante de la complementariedad” o “CDR” (por ejemplo, alrededor de aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el V_L, y alrededor de aproximadamente 31-35B (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el V_H (Kabat *et al*., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los residuos de un “bucle hipervariable” (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el V_L, y 26-32 (H1), 52A-55 (H2) y 96-101 (H3) en el V_H (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol*. 196:901-917 (1987)).

Los residuos de la “región estructural” o “FR” son los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable, como se define en el presente documento.

Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; diacuerpos en tándem (taDb), anticuerpos lineales (por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.641.870, ejemplo 2; Zapata *et al*., *Protein Eng*. 8(10):1057-1062 (1995)); anticuerpos de un solo brazo, anticuerpos de dominio variable único, minicuerpos, moléculas de anticuerpo monocatenario; anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo (porejemplo, incluyendo pero sin limitarse a, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-CH3, (scFV)4-Fc, di-scFv, bi-scFv o (di, tri) en tándem-scFv); y captadores biespecíficos de linfocitos T (BiTE).

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión a antígeno y todavía puede reticular el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y de una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprenda solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad más baja que todo el sitio de unión.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes tienen al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se producían originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Se pueden asignar las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, se pueden asignar anticuerpos a diferentes clases. Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas se pueden dividir, además, en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se llaman α, δ, ε, γ y μ respectivamente. Se conocen bien las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las clases de inmunoglobulinas diferentes.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido único. En algunos modos de realización, el polipéptido Fv comprende además un conector de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase, por ejemplo, Plückthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H-V_L). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se apareen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Se describen más completamente diacuerpos, por ejemplo, en el documento EP 404.097; documento WO 93/11161; y Hollinger *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

El término "anticuerpo multiespecífico" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente un anticuerpo que tiene especificidad poliepitópica. Dichos anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada (V_H) y un dominio variable de la cadena ligera (V_L), donde la unidad V_HV_L tiene especificidad poliepitópica, anticuerpos que tienen dos o más dominios V_L y V_H uniéndose cada unidad V_HV_L a un epítopo diferente, anticuerpos que tienen dos o más dominios variables únicos, uniéndose cada dominio variable único a un epítopo diferente, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos biespecíficos, triacuerpos, anticuerpos trifuncionales, fragmentos de anticuerpo que se han enlazado de forma covalente o no covalente. "Especificidad poliepitópica" se refiere a la capacidad de unirse específicamente a dos o más epítopos diferentes en la(s) misma(s) o diferente(s) diana(s). "Monoespecífico" se refiere a la capacidad de unirse solo a un epítopo. De acuerdo con un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo IgG que se une a cada epítopo con una afinidad de 5 μM a 0,001 pM, de 3 μM a 0,001 pM, de 1 μM a 0,001 pM, de 0,5 μM a 0,001 pM o de 0,1 μM a 0,001 pM.

La expresión "anticuerpos de dominio único" (sdAb) o "anticuerpos de dominio variable único (SVD)" se refiere, en general, a anticuerpos en los que un dominio variable único (VH o VL) puede conferir unión a antígeno. En otras palabras, el dominio variable único no necesita interaccionar con otro dominio variable a fin de reconocer el antígeno diana. Los ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen los derivados de camélidos (llamas y camellos) y peces cartilaginosos (por ejemplo, tiburones nodriza) y los derivados de procedimientos recombinantes de anticuerpos humanos y de ratón Nature (1989) 341:544-546; Dev Comp Immunol (2006) 30:43-56; Trend Biochem Sci (2001) 26:230-235; Trends Biotechnol (2003):21:484-490; documento WO 2005/035572; documento WO 03/035694; Febs Lett (1994) 339:285-290; documento WO 00/29004; documento WO 02/051870).

El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, excepto por posibles variantes que puedan surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades escasas. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos frente a determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en tanto que no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, se pueden preparar los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento mediante el procedimiento de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al*., *Nature* 256:495 (1975), o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también se pueden aislar de colecciones de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al*., *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks *et al*., *J. Mol. Biol*. 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, tal como babuino, macaco de la India o macaco cangrejero) y secuencias de la región constante humanas (pat. de EE.UU. n.º 5.693.780).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Se pueden realizar estas modificaciones para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un, y típicamente dos, dominios variables en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, excepto por la(s) sustitución/sustituciones en FR como se señala anteriormente. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para obtener más detalles, véase Jones *et al*., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al*., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol*. 2:593-596 (1992).

Para los propósitos en el presente documento, un “anticuerpo intacto” es uno que comprende dominios variables pesados y ligeros, así como una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Los “anticuerpos naturales” son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina diferentes. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

Un “anticuerpo no marcado” es un anticuerpo (como se define en el presente documento) que no se conjuga con una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico o radiomarcador.

En algunos modos de realización, “funciones efectoras” de anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular.

“Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos” y “ADCC” se refieren a una reacción celular en la que las células citotóxicas no específicas que expresan los receptores Fc (FcR) (por ejemplo, los linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen un anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar la actividad de ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998).

Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En algunos modos de realización, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo la función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; siendo preferentes las PBMC y los linfocitos NK.

“Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la capacidad de una molécula de lisar una diana en presencia del complemento. La vía de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo)) que forma complejos con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al*., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

Los términos “receptor Fc” o “FcR” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunos modos de realización, el FcR es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferente es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII e FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas empalmadas de forma alternativa de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor de activación”) y FcγRIIB (un “receptor de inhibición”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase Daëron, *Annu. Rev. Immunol*. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel *et al*., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al., J. Lab. Clin. Med*. 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se vayan a identificar en el futuro, se engloban por el término “FcR” en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al., J. Immunol*. 117:587 (1976) y Kim *et al., J. Immunol*. 24:249 (1994)).

“Contaminantes” se refiere a materiales que son diferentes del producto de polipéptido deseado. En algunos modos de realización de la invención, los contaminantes incluyen variantes con carga del polipéptido. En algunos modos de realización de la invención, los contaminantes incluyen variantes con carga de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En otros modos de realización, el contaminante incluye, sin limitación: materiales de la célula huésped, tales como CHOP, proteína A lixiviada; ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado o derivado del polipéptido deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante vírico; componente del medio de cultivo de células, etc. En algunos ejemplos, el contaminante puede ser una proteína de célula huésped (HCP), por ejemplo, pero sin limitarse a, de una célula bacteriana, tal como una célula de *E. coli*, una célula de insecto, una célula procariota, una célula eucariota, una célula de levadura, una célula de mamífero, una célula aviar, una célula fúngica.

Como se usa en el presente documento, el término “inmunoadhesina” designa moléculas similares a anticuerpo que combinan la especificidad de unión de un polipéptido heterólogo con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento de y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga”), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina es típicamente una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. Se puede obtener la secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

Como se usa en el presente documento, “esencialmente el mismo” indica que no se ha alterado un valor o parámetro en un efecto significativo. Por ejemplo, una fuerza iónica de una fase móvil de cromatografía a la salida de la columna es esencialmente la misma que la fuerza iónica inicial de la fase móvil si la fuerza iónica no ha cambiado significativamente. Por ejemplo, una fuerza iónica a la salida de la columna que está en un 10 %, 5 % o 1 % de la fuerza iónica inicial es esencialmente la misma que la fuerza iónica inicial.

La referencia a “aproximadamente” de un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que se dirigen a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que se refiere a “aproximadamente X” incluye la descripción de “X”.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un/a”, “o” y “el/la” incluyen referentes al plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Se entiende que los aspectos y variaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen “que consisten en” y/o “que consisten esencialmente en” aspectos y variaciones.

II. Procedimientos de cromatografía

A. Determinación de las condiciones de separación por cromatografía de intercambio iónico óptimas

La invención proporciona procedimientos para predecir las condiciones de intercambio iónico óptimas para realizar una IEC en un polipéptido de tal manera que se minimice la pérdida de resolución con los cambios en el pH y en la temperatura. En algunos modos de realización, se usa la cromatografía de intercambio iónico para detectar contaminantes en una composición que comprende un polipéptido. En algunos modos de realización, el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos modos de realización, el contaminante es una variante con carga; por ejemplo, una variante con carga básica y/o una variante con carga ácida del polipéptido, incluyendo variantes con carga básicas y/o variantes con carga ácidas de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo.

En algunos modos de realización de la invención, se identifican las condiciones donde el polipéptido está en equilibrio de carga. La representación mediante un gráfico del estado de carga neta de un polipéptido (z) frente al pH demuestra este equilibrio. Se crea la curva usando la secuencia de aminoácidos del polipéptido. La región de la curva con la pendiente más cercana a cero es representativa del equilibrio de carga. En el equilibrio, el estado de carga neta del polipéptido resiste el cambio debido a un cambio de pH, mostrado gráficamente como la región más plana en la curva (figura 1). La estabilidad del estado de carga del polipéptido contribuye a la solidez del ensayo. La condición donde un polipéptido está en equilibrio se puede obtener ajustando la 2.ª derivada de la ecuación para la línea de z a pH igual a 0. Esto en un punto de inflexión de una curva donde la curva pasa de cóncava a convexa o viceversa. Aunque existen múltiples puntos de inflexión (PI) en esta curva (no mostrados en la figura 1), el punto de inflexión de interés está en la región biológica donde el valor absoluto de la pendiente ya no disminuye. Este PI produce un procedimiento notablemente sólido debido a la estabilidad del estado de carga con respecto al pH.

El equilibrio de carga de un polipéptido es una carga óptima ideal para la resolución de la IEC debido a que se pueden detectar contaminantes con ligeras diferencias en la carga neta en comparación con un polipéptido diana en un intervalo de valores de pH. Esto se debe a la estructura y propiedades de los aminoácidos que comprenden el polipéptido. Se usan seis aminoácidos para calcular el estado de carga neta (z) (tabla 1) debido a que desempeñan un papel importante en la definición de las características dependientes del pH de una proteína. Se usan las constantes de disociación ácida, pKa, definidas como ($-\log_{10}K_a$) y basadas en la proporción constante [A-] / [HA] para calcular el estado de carga de un aminoácido. Sin embargo, el resultado no es el valor real, sino la probabilidad de ese estado de carga, P.

Tabla 1. Constantes de disociación ácida de aminoácidos seleccionados.

Aminoácido	pKa_3
Asparagina; D	3,65
Ácido glutámico; E	4,25
Histidina; H	6,02
Tirosina; Y	10,1
Lisina; K	10,53
Arginina; R	12,48

$$P = \left(\frac{10^{(pH-pKa)}}{10^{(pH-pKa)} + 1} \right)$$

Ecuación 1

Por ejemplo, usando la ecuación 1 para histidina a pH 6,5, $P = 10^{(6,5-6)}/(10^{(6,5-6)} + 1) \approx 0,76$. Esto indica que cada residuo de histidina en un polipéptido que contiene diez residuos de histidina a pH 6,5 tendrá una probabilidad de un 76 % de no estar protonado, en lugar de una carga de +0,24 (1-0,76). En otras palabras, a un pH de 6,5, aproximadamente tres de cada cuatro residuos de histidina en el polipéptido no estarán protonados. Esto se puede comparar con el cálculo para el polipéptido a pH 7,5 (figura 2B) donde prácticamente todos los residuos de histidina están desprotonados. La frecuencia del estado de carga más prevalente disminuye a medida que el pH se acerca a la pKa de la cadena lateral de un aminoácido.

La aplicación de esta ecuación a los aminoácidos críticos demuestra por qué trabajar en el equilibrio proporciona una resolución óptima. Ponderando las probabilidades de los seis aminoácidos determinantes de carga en el intervalo de pH, se pueden obtener los estados de carga más homogéneos (figura 3). La presencia de diferentes estados de carga debido a la probable distribución de las especies protonadas enturbiará los resultados y dificultará la capacidad de detectar contaminantes con ligeros cambios en la distribución de carga neta en comparación con el polipéptido objeto. En algunos modos de realización, se representa un gráfico en 3D de la distribución de carga neta frente al pH. Se logra una resolución más alta donde el pico de carga frente al pH frente a la frecuencia es el más agudo (figura 5). Por lo tanto, las mismas condiciones de pH y temperatura en cuanto a la solidez crean una resolución óptima.

En algunos modos de realización de la invención, se determina la distribución de la frecuencia de carga por medio de la entropía de Shannon, que es una medida de la incertidumbre en una variable aleatoria (ecuación 2). En base al número de residuos de cada uno de los seis aminoácidos presentes en el polipéptido (lisina, histidina, aspartato, glutamato, tirosina y arginina), se representa la entropía de Shannon a un pH dado para el polipéptido como una función del pH (figura 4) en una temperatura dada. Cuanto más baja sea la entropía de Shannon, más homogénea es la distribución de carga. En algunos modos de realización de la invención, se realiza la cromatografía a un pH y en una temperatura donde la entropía de Shannon está en aproximadamente un mínimo.

Ecuación 2

$$H(X) = -\sum_{i=1}^{n} p(x_i) \log_b p(x_i)$$

Donde:

n = resultados posibles (n=2, protonados o bien no protonados)

p = probabilidad de resultado o acontecimiento (x_i) (véase la ecuación 1)

b = n.º de ensayos (n.º de residuos de aminoácido cargados)

En algunos modos de realización de la invención, se determinan las condiciones de separación por cromatografía de intercambio iónico óptimas para una pluralidad de polipéptidos diferentes, de tal manera que se use un procedimiento de cromatografía común para analizar múltiples productos de polipéptido; por ejemplo, múltiples productos de anticuerpo. En algunos modos de realización, se analizan los múltiples productos de polipéptido (por ejemplo, múltiples productos de anticuerpo) para determinar la presencia de contaminantes tales como variantes con carga usando un procedimiento de cromatografía común identificado mediante los procedimientos descritos en el presente documento. Una ventaja significativa de la presente invención es que el PI para muchos polipéptidos, incluyendo muchos mAb, se produce al mismo pH (figura 7), difiriendo solo en el número de cargas en ese punto. Por lo tanto, las condiciones óptimas para todas las IEC para estos polipéptidos serán las mismas; es decir, al pH y a la temperatura donde el polipéptido está en equilibrio de carga.

Para garantizar que los cambios en las condiciones no provocan una desviación del PI, se usa el valor del término *dPI/dT*. El *dPI/dT* de una proteína es el cambio en el punto de inflexión de un polipéptido en una curva de carga neta frente al pH con respecto a un cambio en la temperatura. El punto de inflexión para un polipéptido dado fluctuará en base a la temperatura para la que se determina la representación de la carga neta frente al pH. Sin embargo, aunque el pH en el punto de inflexión disminuye con una temperatura en incremento (por ejemplo, véanse las figuras 8 y 9), la carga neta permanece constante. Por lo tanto, optimizar la cromatografía en cuanto al punto de inflexión también proporciona la solidez del procedimiento de intercambio iónico frente a las fluctuaciones de temperatura.

En algunos modos de realización, la invención proporciona un medio para determinar el tipo de cromatografía de intercambio iónico para usarlo para un polipéptido dado de múltiples polipéptidos. Por ejemplo, si la carga neta en el punto de inflexión es positiva, se usa un material de cromatografía de intercambio catiónico. A continuación, se proporcionan ejemplos no limitantes de materiales de cromatografía de intercambio catiónico. En algunos modos de realización, se usa un procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico común para analizar una pluralidad de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos), en el que la pluralidad de polipéptidos tiene una carga neta positiva en un punto de inflexión común. Si la carga neta en el punto de inflexión es negativa, se usa un material de cromatografía de intercambio aniónico. A continuación, se proporcionan ejemplos no limitantes de materiales de cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, se usa un procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico común para analizar una pluralidad de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos), en el que la pluralidad de polipéptidos tiene una carga neta negativa en un punto de inflexión común.

B. Determinación del sistema tampón óptimo

En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para seleccionar un tampón óptimo para usarlo en el procedimiento de cromatografía. En algunos modos de realización, se usa un sistema tampón con una tasa de cambio similar en la constante de disociación ácida (pKa) que el cambio en el punto de inflexión con un cambio en la temperatura en el procedimiento de cromatografía. Seleccionar un tampón con un cambio en pKa con un cambio en la temperatura (es decir, *dpKa/dT*) aproximadamente igual al *dPI/dT* de la proteína garantiza que cualquier cambio en la temperatura permitirá que la proteína permanezca en el PI, contribuyendo, de este modo, a la solidez de la cromatografía analítica. En algunos modos de realización, $(dPI/dT)_{polipéptido(s)} \approx (dpKa/dT)_{tampón}$. En algunos modos de realización, el tampón es un tampón ACES o un tampón HEPES. Por ejemplo, usando el tampón ACES o HEPES, el estado de carga de un mAb ejemplar en el punto de inflexión cambia en menos de 0,5 por encima de 30 °C (figura 11).

Ecuación 3 $dPI/dT \approx dpKa/dT$

En algunos modos de realización, el tampón proporciona una capacidad de tamponamiento eficaz en el pH en el punto de inflexión. En algunos modos de realización, el dPI/dT del/de los polipéptido(s) es aproximadamente -0,02. En algunos modos de realización, el cambio en la temperatura es de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 50 ºC. En algunos modos de realización, dPI/dT=dpKa/dT±1 %, dPI/dT=dpKa/dT±2 %, dPI/dT=dpKa/dT±3 %, dPI/dT=dpKa/dT±4 %, dPI/dT=dpKa/dT±5 %, dPI/dT=dpKa/dT±6 %, dPI/dT=dpKa/dT±7 %, dPI/dT=dpKa/dT±8 %, dPI/dT=dpKa/dT±9 %, dPI/dT=dpKa/dT±10 %, dPI/dT=dpKa/dT±20 %, dPI/dT=dpKa/dT±30 %, dPI/dT=dpKa/dT±40 % o dPI/dT=dpKa/dT±50 %. En algunos modos de realización, la carga neta del/de los polipéptido(s) en el tampón seleccionado cambia en menos de 1 en por encima de más de aproximadamente 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C o 30 °C.

En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para desarrollar una IEC para polipéptidos de múltiples productos de alta resolución y sólida para detectar contaminantes, tales como variantes con carga. Las condiciones se diseñan de tal manera que el polipéptido (por ejemplo, mAb) esté en equilibrio de carga para mejorar la resolución de las variantes cargadas del polipéptido original. Se determina el equilibrio de carga para una serie de productos de polipéptido (por ejemplo, productos de mAb) representando mediante un gráfico el estado de carga neta calculada (z) frente al pH. La condición en la que un polipéptido está en equilibrio se obtiene ajustando la 2.ª derivada de la ecuación para la línea de z a pH igual a 0.

La carga neta de un polipéptido a un pH dado se determina en base al contenido de seis aminoácidos en el mAb que desempeñan un papel importante en la definición de las características dependientes del pH de una proteína en virtud de sus cadenas laterales. Los seis aminoácidos son asparagina, ácido glutámico, histidina, tirosina, lisina y arginina. Se usan las constantes de disociación ácida de los seis aminoácidos (pKa, definida como $-\log_{10}Ka$) para calcular el estado de carga neta (z) (tabla 1). Por ejemplo, a valores de pH por debajo de 6,02, en promedio una histidina está protonada y tiene una carga positiva, mientras que a valores de pH por encima de 6,02, en promedio una histidina no está protonada y no tiene carga. Se determinó la probabilidad del estado de carga más abundante para un pH dado para cada uno de los seis aminoácidos y se determinó la probabilidad ponderada de carga de mAb1 a un pH dado en base al número de residuos de cada uno de estos seis aminoácidos presentes en el anticuerpo. También se puede determinar la distribución de la frecuencia de carga por medio de la entropía de Shannon, que es una medida de la incertidumbre en una variable aleatoria (ecuación 3). En base al número de residuos de cada uno de estos seis aminoácidos presentes en el polipéptido, se puede representar la entropía de Shannon a un pH dado para el polipéptido como una función del pH. Cuanto más baja sea la entropía de Shannon, más homogénea es la distribución de carga. A partir de estos datos, se representa la distribución de la carga neta del polipéptido como una función del pH y se determina el punto de inflexión (PI) más próximo a pH neutro. Este es el pH con el estado de carga más homogéneo y dará como resultado los picos más agudos en la separación por IEC. Para desarrollar un protocolo para IEC de múltiples productos, se determinan los puntos de inflexión para una serie de polipéptidos diana (por ejemplo, MAb diana) con pI diferentes. Seleccionar como diana el PI puede mejorar la solidez en cuanto al pH de la IEC.

El término dPI/dT representa el cambio en el PI de una molécula con un cambio en la temperatura. A partir de estos resultados, se puede elegir un tampón óptimo donde el cambio en la constante de disociación ácida del tampón como una función de la temperatura se acerque a dPI/dT (es decir, dPI/dT≈dpKa/dT) para minimizar el efecto de la temperatura y mejorar la solidez del ensayo. Los valores publicados del cambio en pKa como una función de la temperatura (dpKa/dT) para una serie de tampones son como sigue: fosfato: -0,0028, HEPES: -0,014, ACES: -0,02, Tris: -0,028, bicina: -0,018, tricina: -0,021, TAPS: -0,02 y CHES: -0,018 (Benyon, RJ y Easterby, JS, Buffer Solutions The Basics, IRL Press, 1996).

En algunos aspectos, la invención proporciona un procedimiento para analizar una pluralidad de composiciones de anticuerpo, en el que cada composición de anticuerpo comprende un anticuerpo y una o más variantes con carga del anticuerpo, en el que el procedimiento separa eficazmente el anticuerpo de sus variantes con carga; para cada composición de anticuerpo, el procedimiento comprende, a) unir el anticuerpo y una o más variantes con carga a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga a un caudal de aproximadamente 1 ml/minuto, en el que el tampón de carga comprende un tampón HEPES 10 mM a aproximadamente pH 7,6 a aproximadamente 40 ºC; b) eluir el anticuerpo y las variantes con carga contaminantes del material de cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente de un tampón de elución, en el que el tampón de elución comprende aproximadamente tampón HEPES 10 mM a aproximadamente pH 7,6 y NaCl, en el que la concentración del NaCl se incrementa en el gradiente de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 80 mM en aproximadamente 40 minutos, en el que el anticuerpo y sus variantes con carga se separan mediante el gradiente; y c) detectar el anticuerpo y la una o más variantes con carga. En algunos modos de realización, la pluralidad de composiciones de anticuerpo comprende diferentes anticuerpos. En algunos modos de realización, la pluralidad de composiciones de anticuerpo comprende anticuerpos con pI diferentes.

C. Cromatografía

En algunos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos de análisis de composiciones que comprenden un polipéptido y uno o más contaminantes, por ejemplo, variantes de polipéptido, que comprenden unir el polipéptido y uno o más contaminantes a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga con una fuerza iónica inicial, eluir el polipéptido y uno o más contaminantes de la columna de intercambio iónico usando un tampón de elución, en los que se altera la fuerza iónica del tampón de elución mediante un gradiente de fuerza iónica de tal manera que los polipéptidos y el uno o más contaminantes se eluyan del material de cromatografía como entidades separadas distintas. En algunos aspectos de la divulgación, los procedimientos de cromatografía son adecuados para múltiples polipéptidos (por ejemplo, productos de polipéptido) con un pI variable. Por ejemplo, se pueden usar los procedimientos para una serie de productos de anticuerpo diferentes con pI que varían de 6,0 a 9,5. En otros aspectos de la divulgación, los procedimientos de cromatografía incluyen el uso de un tampón óptimo identificado mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de cromatografía es un material de intercambio catiónico. En algunos modos de realización, se usa un material de intercambio catiónico cuando el polipéptido está cargado positivamente en el punto de inflexión como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización, el material de intercambio catiónico es una fase sólida que está cargada negativamente y tiene cationes libres para su intercambio con cationes en una solución acuosa que se hace pasar por o a través de la fase sólida. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio catiónico puede ser una membrana, monolito o resina. En algunos modos de realización, el material de intercambio catiónico puede ser una resina. El material de intercambio catiónico puede comprender un grupo funcional ácido carboxílico o un grupo funcional ácido sulfónico tal como, pero sin limitarse a, sulfonato, carboxílico, ácido carboximetilsulfónico, sulfoisobutilo, sulfoetilo, carboxilo, sulfopropilo, sulfonilo, sulfoxietilo u ortofosfato. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio catiónico es una columna de cromatografía de intercambio catiónico. En algunos modos de realización, se usa un material de cromatografía de intercambio catiónico para polipéptidos diferentes, por ejemplo, anticuerpos diferentes o fragmentos de los mismos, con pI que varían de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,5. En algunos modos de realización, se usa el material de cromatografía de intercambio catiónico en procedimientos de cromatografía que usan un tampón óptimo identificado mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

En la técnica se conocen ejemplos de materiales de intercambio catiónico e incluyen, pero no se limitan a Mustang S, Sartobind S, SO3 Monolith, S Ceramic HyperD, Poros XS, Poros HS50, Poros HS20, SPSFF, SP-Sepharose XL (SPXL), CM Sepharose Fast Flow, Capto S, Fractogel Se HiCap, Fractogel SO3 o Fractogel COO. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio catiónico es Poros HS50. En algunos modos de realización, la resina Poros HS puede ser partículas Poros HS de 50 µm o Poros HS de 20 µm. Los ejemplos de columnas de cromatografía de intercambio catiónico para su uso en los procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a ProPac WCX-10, ProPac WCX-10HT, MabPac SCX-10 5 µm y MabPac SCX-10 10 µm.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de cromatografía es un material de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, se usa un

material de intercambio aniónico cuando el polipéptido está cargado negativamente en el punto de inflexión como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una fase sólida que está cargada positivamente y tiene aniones libres para su intercambio con aniones en una solución acuosa que se hace pasar por o a través de la fase sólida. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio aniónico puede ser una membrana, monolito o resina. En un modo de realización, el material de intercambio aniónico puede ser una resina. En algunos modos de realización, el material de intercambio aniónico puede comprender una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria o un grupo funcional de ion amonio cuaternario, un grupo funcional poliamina o un grupo funcional dietilaminoetilo. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una columna de cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, se usa un material de cromatografía de intercambio aniónico para un polipéptido, por ejemplo, y un anticuerpo o fragmento del mismo, con un pI de menos de aproximadamente 7. En algunos modos de realización, se usa un material de cromatografía de intercambio aniónico para polipéptidos diferentes, por ejemplo, anticuerpos diferentes o fragmentos de los mismos, con pI que varían de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0. En algunos modos de realización, se usa el material de cromatografía de intercambio aniónico en procedimientos de cromatografía que usan un tampón óptimo identificado mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

En la técnica se conocen ejemplos de materiales de intercambio aniónico e incluyen, pero no se limitan a Poros HQ 50, Poros PI 50, Poros D, Mustang Q, Q Sepharose FF y DEAE Sepharose. Los ejemplos de columnas de cromatografía de intercambio aniónico para su uso en los procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a, Dionex ProPac 10 SAX y Tosoh GSKgel Q STAT 7 µM WAX.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de cromatografía es un material en modo mixto que comprende grupos funcionales con una o más de las siguientes funcionalidades: intercambio aniónico, intercambio catiónico, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas. En algunos modos de realización, el material en modo mixto comprende grupos funcionales con intercambio aniónico e interacciones hidrófobas. El material en modo mixto puede contener N-bencil-N-metiletanolamina, 4-mercapto-etil-piridina, hexilamina o fenilpropilamina como ligando o contener polialilamina reticulada. Los ejemplos de materiales en modo mixto incluyen resina Capto Adhere, resina QMA, resina Capto MMC, resina MEP HyperCel, resina HEA HyperCel, resina PPA HyperCel o membrana ChromaSorb o Sartobind STIC. En algunos modos de realización, el material en modo mixto es una resina Capto Adhere. En algunos modos de realización de lo anterior, el material en modo mixto es una columna de cromatografía en modo mixto.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio iónico puede utilizar un material de cromatografía convencional o un material de cromatografía convectivo. Los materiales de cromatografía convencionales incluyen, por ejemplo, materiales perfusivos (por ejemplo, resina de poli(estireno-divinilbenceno)) y materiales difusivos (por ejemplo, resina de agarosa reticulada). En algunos modos de realización, la resina de poli(estireno-divinilbenceno) puede ser una resina Poros. En algunos modos de realización, la resina de agarosa reticulada puede ser resina de sulfopropil-Sepharose Fast Flow (“SPSFF”). El material de cromatografía de convectivo puede ser una membrana (por ejemplo, polietersulfona) o un material monolítico (por ejemplo, polímero reticulado). La membrana de polietersulfona puede ser Mustang. El material monolítico de polímero reticulado puede ser poli(metacrilato de glicidilo-co-dimetacrilato de etileno) reticulado.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos de la invención, el material de cromatografía está en una columna de cromatografía; por ejemplo, una columna de cromatografía de intercambio catiónico o una columna de cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, se usa la columna de cromatografía para cromatografía de líquidos. En algunos modos de realización, se usa la columna de cromatografía para cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC). En algunos modos de realización, la columna de cromatografía es una columna de cromatografía de HPLC; por ejemplo, una columna de HPLC de intercambio catiónico o una columna de HPLC de intercambio aniónico.

Un procedimiento de HPLC ejemplar que se puede usar para los procedimientos de cromatografía de múltiples productos de la invención es como sigue; sin embargo, no se interpretan los procedimientos de la invención para que queden vinculados a estos procedimientos. Se añaden las muestras al automuestreador y se refrigeran (5 ± 3 °C). Las columnas se disponen en el compartimento de columna y se puede emplear un rasgo característico de control de temperatura para mantener la temperatura del compartimento en un intervalo reducido (±1 °C) desde el punto de ajuste durante el análisis. El efluente de columna se monitoriza a 280 nm.

Las muestras se diluyen con la fase móvil a una concentración de polipéptido diana de aproximadamente 1-2 mg/ml. En algunos modos de realización, se puede digerir el polipéptido con carboxipeptidasa B (CpB), añadida en una proporción de 1:100 (p/p), e incubar a 37 °C durante 20 min. Las muestras se pueden almacenar a 5 °C hasta su análisis.

El instrumento puede incluir una bomba de gradiente cuaternaria de baja presión, un automuestreador de separación rápida con capacidad de controlar la temperatura, un compartimento de columna de control térmico y un detector UV de haz de diodos. En la salida del detector, se puede conectar un monitor de conductividad y pH PCM-3000 para obtener datos de pH y conductividad en tiempo real. Se pueden realizar controles de instrumentos, adquisición de datos y análisis de datos; por ejemplo, usando el programa informático Thermo Scientific Dionex Chromeleon, versión 6,8.

Las muestras se diluyen a 2 mg/ml con agua desionizada y se pueden mantener a 5±3 °C en el automuestreador. Se dispone una columna MabPac SCX-10 de 4 × 250 mm en el compartimento de columna con el ajuste de temperatura a 37±1 °C. Para cada desarrollo cromatográfico, se inyectan 10 µl de proteína (20 µg). El tampón A es ACES 5 mM pH 7,5 a 37 ºC. El tampón B es NaCl 180 mM en el tampón A. El gradiente es NaCl 0-100 mM en 100 min a 1 mM/min mezclando el tampón B en el tampón A. El caudal es de 0,8 ml/min. La proteína se detecta mediante absorbancia a 280 nm. En algunos modos de realización, el tampón A es un tampón HEPES 10 mM, pH 7,6 a 40 ºC, y el tampón B es NaCl 100 mM.

La elución, como se usa en el presente documento, es la retirada del producto, por ejemplo, el polipéptido, y/o contaminantes del material de cromatografía. El tampón de elución es el tampón usado para eluir el polipéptido u otro producto de interés a partir de un material de cromatografía. En algunos modos de realización, el tampón de elución es parte de la fase móvil de la cromatografía. En algunos modos de realización, se aplica la composición que comprende el polipéptido y los contaminantes al material de cromatografía como parte de la fase móvil. A continuación, se altera la fase móvil para permitir la separación del polipéptido de los contaminantes a medida que el polipéptido y los contaminantes se eluyen del material de cromatografía. En muchos casos, un tampón de elución tiene una característica física diferente del tampón de carga. En algunos modos de realización, la fuerza iónica del tampón de elución se incrementa durante el curso de la elución en comparación con el tampón de carga. En algunos modos de realización, la cromatografía es un procedimiento de cromatografía de múltiples productos. En algunos modos de realización, el tampón de elución comprende un tampón óptimo identificado mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

En algunos modos de realización, el gradiente de fuerza iónica es un gradiente salino. En algunos modos de realización, el gradiente salino es un gradiente de aproximadamente sal 0 mM a aproximadamente sal 200 mM. En algunos modos de realización, el gradiente salino es cualquiera de de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 100 mM, 0 mM a aproximadamente 60 mM, 0 mM a aproximadamente 50 mM, 0 mM a aproximadamente 40 mM, 0 mM a aproximadamente 30 mM, 0 mM a aproximadamente 20 mM, 0 mM a aproximadamente 10 mM, 10 mM a aproximadamente 200 mM, 10 mM a aproximadamente 100 mM, 10 mM a aproximadamente 50 mM, 10 mM a aproximadamente 40 mM, 10 mM a aproximadamente 30 mM, 10 mM a aproximadamente 20 mM, 20 mM a aproximadamente 200 mM, 20 mM a aproximadamente 100 mM, 20 mM a aproximadamente 50 mM, 20 mM a aproximadamente 30 mM, 30 mM a aproximadamente 200 mM, 30 mM a aproximadamente 100 mM y 30 mM a aproximadamente 50 mM.

En algunos modos de realización de la invención, la fuerza iónica de la fase móvil, por ejemplo, el tampón de elución, se mide mediante la conductividad de la fase móvil. Conductividad se refiere a la capacidad de una solución acuosa de conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En solución, la corriente fluye mediante transporte iónico. Por lo tanto, con una cantidad en incremento de iones presentes en la solución acuosa, la solución tendrá una conductividad más alta. La unidad de medida básica para la conductividad es el siemensio (o mho), mho (mS/cm), y se puede medir usando un conductímetro, tal como diversos modelos de conductímetros Orion. Puesto que la conductividad electrolítica es la capacidad de los iones en una solución de transportar corriente eléctrica, se puede alterar la conductividad de una solución cambiando la concentración de iones en la misma. Por ejemplo, se pueden alterar la concentración de un agente de tamponamiento y/o la concentración de una sal (por ejemplo, cloruro de sodio, acetato de sodio o cloruro de potasio) en la solución a fin de lograr la conductividad deseada. Preferentemente, se modifica la concentración de sal de los diversos tampones para lograr la conductividad deseada.

En algunos modos de realización, la fase móvil de la cromatografía tiene una conductividad inicial de más de aproximadamente cualquiera de 0,0 mS/cm, 0,5 mS/cm, 1,0 mS/cm, 1,5 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,5 mS/cm, 3,0 mS/cm, 3,5 mS/cm, 4,0 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17,0 mS/cm, 18,0 mS/cm, 19,0 mS/cm o 20,0 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad de la fase móvil se incrementa durante el curso de la cromatografía, por ejemplo, mediante un gradiente de fuerza iónica. En algunos modos de realización, la conductividad de la fase móvil al finalizar la elución es más de aproximadamente cualquiera de 1,0 mS/cm, 1,5 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,5 mS/cm, 3,0 mS/cm, 3,5 mS/cm, 4,0 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17,0 mS/cm, 18,0 mS/cm, 19,0 mS/cm o 20,0 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad de la fase móvil se incrementa en un gradiente lineal. En algunos modos de realización, la conductividad de la fase móvil se incrementa en un gradiente escalonado que comprende una de más etapas.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento; por ejemplo, un procedimiento de cromatografía de múltiples productos o un procedimiento de cromatografía que comprende un tampón óptimo identificado mediante los procedimientos descritos en el presente documento, la composición que comprende un polipéptido y uno o más contaminantes se carga en el material de cromatografía en una cantidad de más de una cualquiera de aproximadamente 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg, 7 µg, 8 µg, 9 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg, 25 µg o 50 µg. En algunos modos de realización, se carga la composición en el material de cromatografía a una concentración de más de una cualquiera de aproximadamente 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml y 5,0 mg/ml. En algunos modos de realización, la composición se diluye antes de su carga en el material de cromatografía; por ejemplo, diluida 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 o mayor de 1:10. En algunos modos de realización, la composición se diluye en la fase móvil de la cromatografía. En algunos modos de realización, la composición se diluye en un tampón de carga.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el caudal es más de aproximadamente cualquiera de 0,5 ml/min, 0,6 ml/min, 0,7 ml/min, 0,8 ml/min, 0,9 ml/min, 1,0 ml/min. 1,1 ml/min, 1,2 ml/min, 1,3 ml/min, 1,4 ml/min, 1,5 ml/min, 1,75 ml/min y 2,0 ml/min.

En algunos modos de realización de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de cromatografía está en una columna. En algunos modos de realización, la columna es una columna de HPLC. En algunos modos de realización, la columna tiene una de las siguientes dimensiones: 4 × 50 mm, 4 × 100 mm, 4 × 150 mm, 4 × 200 mm, 4 × 250 mm o 2 × 250 mm.

D. Detección de variantes con carga

En algunos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos de detección de variantes de un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) en una composición que comprende el polipéptido y una o más variantes en la composición del polipéptido. En algunos aspectos de la divulgación, se analizan las variantes del polipéptido usando condiciones de separación por cromatografía de intercambio iónico optimizadas como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se analizan las variantes del polipéptido usando cromatografía de intercambio iónico en los que se ha optimizado el tampón como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se analizan las variantes del polipéptido usando cromatografía de intercambio iónico en los que se optimizan las condiciones de separación y el tampón como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se optimizan las condiciones de separación por cromatografía de intercambio iónico y/o el tampón para una pluralidad de polipéptidos; por ejemplo, identificando un valor de dPI/dT común para uno o más polipéptidos diana (por ejemplo, uno o más anticuerpos). El procedimiento que comprende unir el polipéptido y una o más variantes a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga con una fuerza iónica inicial, eluir el polipéptido y uno o más contaminantes de la columna de intercambio iónico usando un tampón de elución, en el que se altera la fuerza iónica del tampón de elución mediante un gradiente de fuerza iónica de tal manera que los polipéptidos y el uno o más contaminantes se eluyan del material de cromatografía como entidades separadas distintas. A continuación, se analizan los eluyentes de la cromatografía para determinar el polipéptido original y la presencia de variantes. Las variantes del polipéptido pueden incluir variantes ácidas del polipéptido y variantes básicas del polipéptido original. Los ejemplos de variantes ácidas, es decir, variantes con un pI menor que el pI del polipéptido original, incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos donde se han desamidado uno o más residuos de glutamina y/o asparagina. Los ejemplos de variantes de polipéptido básicas, es decir, variantes con un pI mayor que el pI del polipéptido original, incluyen, pero no se limitan a variantes donde un residuo de ácido aspártico ha sufrido una modificación con respecto a un resto de succinimida. En algunos aspectos de la divulgación, los polipéptidos tienen un pI que varía de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido es un anticuerpo que tiene un pI que varía de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,5.

E. Determinación de la pureza de un polipéptido en una composición

En algunos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos de determinación de la pureza de un polipéptido en una composición que comprende el polipéptido. En algunos aspectos de la divulgación, se analiza la pureza del polipéptido en la composición usando las condiciones de separación por cromatografía de intercambio iónico optimizadas como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se analiza la pureza del polipéptido en la composición usando cromatografía de intercambio iónico en los que se ha optimizado el tampón como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se analiza la pureza del polipéptido en la composición usando cromatografía de intercambio iónico, en los que se optimizan las condiciones de separación y el tampón como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se optimizan las condiciones de separación por cromatografía de intercambio iónico y/o el tampón para una pluralidad de polipéptidos; por ejemplo, identificando un valor de dPI/dT común para uno o más polipéptidos diana (por ejemplo, uno o más anticuerpos). El procedimiento que comprende unir el polipéptido y uno o más contaminantes a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga con una fuerza iónica inicial, eluir el polipéptido y uno o más contaminantes de la columna de intercambio iónico usando un tampón de elución, en el que se altera la fuerza iónica del tampón de elución mediante un gradiente de fuerza iónica de tal manera que los polipéptidos y el uno o más contaminantes se eluyan del material de cromatografía como entidades separadas distintas. La pureza del polipéptido se puede evaluar determinando la proporción de la cantidad de polipéptido que se eluye del material de

cromatografía con respecto a la cantidad total de contaminantes, por ejemplo, variantes con carga, que se eluyen del material de cromatografía. En algunos aspectos de la divulgación, los polipéptidos tienen un pI que varía de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido es un anticuerpo que tiene un pI que varía de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,5.

F. Determinación de la estabilidad de un polipéptido en una composición

En algunos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para determinar la estabilidad de un polipéptido en una composición que comprende el polipéptido. En algunos aspectos de la divulgación, se determina la estabilidad del polipéptido en la composición usando cromatografía de intercambio iónico, en los que se optimizan las condiciones de separación como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se determina la estabilidad del polipéptido en la composición usando cromatografía de intercambio iónico en los que se ha optimizado el tampón como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se determina la estabilidad del polipéptido en la composición usando cromatografía de intercambio iónico, en los que se optimizan las condiciones de separación y el tampón como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se optimizan las condiciones de separación por cromatografía de intercambio iónico y/o el tampón para una pluralidad de polipéptidos; por ejemplo, identificando un valor de dPI/dT común para uno o más polipéptidos diana (por ejemplo, uno o más anticuerpos). En algunos aspectos de la divulgación, se analizan con el tiempo las muestras de la composición que comprende el polipéptido. En algunos aspectos de la divulgación, la composición se incuba en diversos momentos antes del análisis. En algunos aspectos de la divulgación, se incuba la composición a más de una cualquiera de aproximadamente 0 °C, 20 °C, 37 °C o 40 °C antes del análisis. En algunos aspectos de la divulgación, la composición se incuba durante uno o más de 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año antes del análisis. A continuación, se analiza la composición uniendo el polipéptido y uno o más contaminantes en la composición a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga y una fuerza iónica inicial, eluyendo el polipéptido y uno o más contaminantes de la columna de intercambio iónico usando un tampón de elución, en la que se altera la fuerza iónica del tampón de elución mediante un gradiente de fuerza iónica de tal manera que los polipéptidos y el uno o más contaminantes se eluyan del material de cromatografía como entidades separadas distintas. El cambio en la proporción de polipéptido con respecto a contaminantes indica la estabilidad del polipéptido en la composición. Por ejemplo, si la proporción de polipéptido con respecto a contaminantes no cambia con el tiempo, el polipéptido se puede considerar estable, mientras que la rápida acumulación de contaminantes con una disminución simultánea de la cantidad de polipéptido en la composición indica que el polipéptido en la composición es menos estable. En algunos aspectos de la divulgación, se analiza la estabilidad del polipéptido en la composición usando cromatografía de intercambio iónico, en los que se optimizan las condiciones de separación como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se analiza la estabilidad del polipéptido en la composición usando cromatografía de intercambio iónico en los que se ha optimizado el tampón como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se analiza la estabilidad del polipéptido en la composición usando cromatografía de intercambio iónico, en los que se optimizan las condiciones de separación y el tampón como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se optimizan las condiciones de separación por cromatografía de intercambio iónico y/o el tampón para una pluralidad de polipéptidos; por ejemplo, identificando un valor de dPI/dT común para uno o más polipéptidos diana (por ejemplo, uno o más anticuerpos). En algunos aspectos de la divulgación, los polipéptidos tienen un pI que varía de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido es un anticuerpo que tiene un pI que varía de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,5. Los ejemplos de polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo.

G. Purificación de polipéptidos

En algunos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos de purificación de un polipéptido tal como un anticuerpo de una composición que comprende el polipéptido y uno o más contaminantes. El procedimiento comprende optimizar las condiciones de separación por cromatografía como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se purifica el polipéptido usando cromatografía, en los que se ha optimizado el tampón como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se purifica el polipéptido usando cromatografía, en los que se optimizan las condiciones de separación y el tampón como se describe anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, se optimizan las condiciones de separación por cromatografía y/o el tampón para una pluralidad de polipéptidos; por ejemplo, identificando un valor de dPI/dT común para uno o más polipéptidos diana (por ejemplo, uno o más anticuerpos). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía es cromatografía de intercambio iónico; por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de intercambio aniónico. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía es cromatografía en modo mixto.

En algunos aspectos de la divulgación, se une el polipéptido y los contaminantes a un material de cromatografía de intercambio iónico o material de cromatografía en modo mixto usando un tampón de carga con un pH en el punto de inflexión del polipéptido a la temperatura de la cromatografía. El tampón de carga tiene una fuerza iónica inicial. A continuación, se eluye el polipéptido del medio de cromatografía de intercambio iónico o del medio de cromatografía en modo mixto usando un tampón de elución, en el que se altera la fuerza iónica del tampón de elución mediante un gradiente de fuerza iónica de tal manera que los polipéptidos y el uno o más contaminantes se eluyan del material de cromatografía como entidades separadas distintas. Se obtienen las fracciones durante la fase de elución de la

cromatografía y se combinan las fracciones que contienen polipéptido sin ningún o con contaminantes mínimos para su procesamiento adicional o para su formulación farmacéutica. Los ejemplos de polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo.

III. Polipéptidos

Se proporcionan polipéptidos para su uso en cualquiera de los procedimientos de cromatografía de intercambio iónico, en los que se optimizan las condiciones de separación como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización de la invención, se analizan las composiciones de un polipéptido mediante cromatografía de intercambio iónico. Dichos procedimientos son útiles en la identificación de variantes con carga del polipéptido en la composición. En algunos modos de realización, el polipéptido es un anticuerpo o fragmento del mismo. En algunos modos de realización, los polipéptidos tienen un pI que varía de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,5. En algunos modos de realización, el polipéptido es un anticuerpo que tiene un pI que varía de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,5. En algunos modos de realización, se proporciona el punto de inflexión (PI) en una curva de carga frente al pH del polipéptido mediante los procedimientos de la invención. En algunos modos de realización, se proporciona el cambio en el PI con un cambio en la temperatura (dPI/dT) mediante los procedimientos de la invención.

En algunos modos de realización, el polipéptido es un polipéptido terapéutico. En algunos modos de realización, el polipéptido es un anticuerpo. En algunos modos de realización, el polipéptido es una inmunoadhesina.

En algunos modos de realización, el polipéptido tiene un peso molecular de más de aproximadamente cualquiera de 5000 dalton, 10.000 dalton, 15.000 dalton, 25.000 dalton, 50.000 dalton, 75.000 dalton, 100.000 dalton, 125.000 dalton o 150.000 dalton. El polipéptido puede tener un peso molecular entre aproximadamente cualquiera de 50.000 dalton a 200.000 dalton o 100.000 dalton a 200.000 dalton. De forma alternativa, el polipéptido para su uso en el presente documento puede tener un peso molecular de aproximadamente 120.000 dalton o aproximadamente 25.000 dalton.

El pI es el punto isoeléctrico y es el pH al que una molécula o superficie particular no tiene carga eléctrica neta. En algunos modos de realización, se puede usar el procedimiento de la invención para una pluralidad de composiciones que comprenden un polipéptido, donde el pI del polipéptido en la composición, por ejemplo, un anticuerpo, varía de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,5. En algunos modos de realización, el polipéptido tiene un pI mayor de aproximadamente 9,5; por ejemplo, de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 12. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el pI del polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo, puede ser menos de aproximadamente 7; por ejemplo, de aproximadamente 4 a aproximadamente 7.

En modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el uno o más contaminantes en una composición que comprende un polipéptido y uno o más contaminantes son variantes con carga de polipéptido. En algunos modos de realización, la variante con carga de polipéptido es un polipéptido que se ha modificado de su estado natural, de tal manera que se altere la carga del polipéptido. En algunos modos de realización, las variantes con carga son más ácidas que el polipéptido original; es decir, tienen un pI más bajo que el polipéptido original. En otros modos de realización, las variantes con carga son más básicas que el polipéptido original; es decir, tienen un pI más alto que el polipéptido original. En algunos modos de realización, se genomanipulan las variantes con carga de polipéptido. En algunos modos de realización, la variante con carga de polipéptido es el resultado de procesos naturales; por ejemplo, oxidación, desamidación, procesamiento C terminal de residuos de lisina, formación de piroglutamato N terminal y glucación. En algunos modos de realización, la variante con carga de polipéptido es una glucoproteína donde se modifica el glucano acoplado a la proteína de tal manera que se altere la carga de la glucoproteína en comparación con la glucoproteína original; por ejemplo, mediante adición de ácido siálico o sus derivados. En algunos modos de realización, la variante con carga de polipéptido es una variante con carga de anticuerpo.

Los polipéptidos que se van a analizar usando los procedimientos descritos en el presente documento se producen, en general, usando técnicas recombinantes. Se describen procedimientos para producir proteínas recombinantes, por ejemplo, en las pat. de EE.UU. n.^{os} 5.534.615 y 4.816.567. En algunos modos de realización, se produce la proteína de interés en una célula de CHO (véase, por ejemplo, el documento WO 94/11026). En algunos modos de realización, se produce el polipéptido de interés en una célula de *E. coli*. Véanse, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 5.648.237; la pat. de EE. UU. n.º 5.789.199 y la pat. de EE. UU. n.º 5.840.523, que describen la región de iniciación de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y la segregación. Véase también Charlton, Methods in Molecular Biology, vol. 248 (B. K. C. Lo, *ed*., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*. Cuando se usan técnicas recombinantes, los polipéptidos se pueden producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o segregar directamente al medio.

Los polipéptidos se pueden recuperar del medio de cultivo o de lisados de células huésped. Se pueden romper las células empleadas en la expresión de los polipéptidos mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, ruptura mecánica o agentes de lisis de células. Si el polipéptido

se produce intracelularmente, como una primera etapa, se retiran los restos de partículas, células huésped o bien fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar polipéptidos que se segregan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta de células en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden retirar mediante centrifugación. Cuando el polipéptido se segrega al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en primer lugar se concentran, en general, usando un filtro de concentración de polipéptidos disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes casuales.

En algunos modos de realización, el polipéptido en la composición que comprende el polipéptido y uno o más contaminantes se ha purificado o purificado parcialmente antes del análisis mediante los procedimientos de la invención. Por ejemplo, el polipéptido de los procedimientos está en un eluyente de una cromatografía de afinidad, una cromatografía de intercambio catiónico, una cromatografía de intercambio aniónico, una cromatografía en modo mixto y una cromatografía de interacción hidrófoba. En algunos modos de realización, el polipéptido está en un eluyente de una cromatografía con proteína A.

Los ejemplos de polipéptidos que se pueden analizar mediante los procedimientos de la invención incluyen pero no se limitan a inmunoglobulinas, inmunoadhesinas, anticuerpos, enzimas, hormonas, proteínas de fusión, proteínas que contienen Fc, inmunoconjugados, citocinas e interleucinas.

(A) *Anticuerpos*

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el polipéptido paa su uso en cualquiera de los procedimientos de análisis de polipéptidos y formulaciones que comprenden los polipéptidos mediante los procedimientos descritos en el presente documento es un anticuerpo.

Las dianas moleculares para anticuerpos incluyen las proteínas CD y sus ligandos, tales como, pero sin limitarse a: (i) CD3, CD4, CD8, CD19, CD11a, CD20, CD22, CD34, CD40, CD79α (CD79a) y CD79β (CD79b); (ii) miembros de la familia de receptores ErbB, tales como el receptor EGF, el receptor HER2, HER3 o HER4; (iii) moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Macl, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina αv/β3, incluyendo las subunidades alfa o bien beta de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); (iv) factores de crecimiento, tales como VEGF; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; proteína C, BR3, c-met, factor tisular, β7, etc. y (v) antígenos asociados a tumor (TAA) de superficie celular y transmembranarios, tales como los descritos en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

Otros anticuerpos ejemplares incluyen los seleccionados de, y sin limitación, anticuerpo antirreceptor de estrógeno, anticuerpo antirreceptor de progesterona, anticuerpo anti-p53, anticuerpo anti-HER-2/neu, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti catepsina D, anticuerpo anti-Bcl-2, anticuerpo anti cadherina E, anticuerpo anti-CA125, anticuerpo anti-CA15-3, anticuerpo anti-CA19-9, anticuerpo anti-c-erbB-2, anticuerpo anti glucoproteína P, anticuerpo anti-CEA, anticuerpo anti proteína del retinoblastoma, anticuerpo anti oncoproteína ras, anticuerpo anti-Lewis X, anticuerpo anti-Ki-67, anticuerpo anti-PCNA, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD4, anticuerpo anti-CD5, anticuerpo anti-CD7, anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD9/p24, anticuerpo anti-CD10, anticuerpo anti-CD11a, anticuerpo anti-CD11c, anticuerpo anti-CD13, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-CD22, anticuerpo anti-CD23, anticuerpo anti-CD30, anticuerpo anti-CD31, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD34, anticuerpo anti-CD35, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-CD41, anticuerpo anti-LCA/CD45, anticuerpo anti-CD45RO, anticuerpo anti-CD45RA, anticuerpo anti-CD39, anticuerpo anti-CD100, anticuerpo anti-CD95/Fas, anticuerpo anti-CD99, anticuerpo anti-CD106, anticuerpo antiubiquitina, anticuerpo anti-CD71, anticuerpo anti-c-myc, anticuerpo anticitoqueratinas, anticuerpo antivimentinas, anticuerpo anti proteínas del PVH, anticuerpo anti cadenas ligeras kappa, anticuerpo anti cadenas ligeras lambda, anticuerpo anti melanosomas, anticuerpo anti antígeno prostático específico, anticuerpo anti-S-100, anticuerpo anti antígeno tau, anticuerpo antifibrina, anticuerpo antiqueratinas y anticuerpo anti antígeno Tn.

(i) Anticuerpos monoclonales

En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Se obtienen anticuerpos monoclonales de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, excepto por posibles variantes que puedan surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades escasas. Por tanto, el modificador “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos o policlonales.

Por ejemplo, se pueden preparar los anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al., Nature* 256:495 (1975), o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (patente de EE. UU n.º 4.816.567).

En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se describe en el presente documento para inducir linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente al polipéptido usado para la inmunización. De forma alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, que contenga preferentemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), previniendo dichas sustancias el crecimiento de células carentes de HGPRT.

En algunos modos de realización, las células de mieloma son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo mediante las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, en algunos modos de realización, las líneas de células de mieloma son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE. UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles del American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE. UU. También se han descrito líneas de células de heteromieloma ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se somete a ensayo para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. En algunos modos de realización, se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos mediante células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson *et al*., *Anal. Biochem*. 107:220 (1980).

Después de que se identifiquen las células de hibridoma que producen anticuerpos de especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, polipéptido A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que se puedan unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). En algunos modos de realización, las células de hibridoma sirven como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, se puede disponer el ADN en vectores de expresión, que, a continuación, se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que de otro modo no producen polipéptido inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al*., *Curr. Opinion in Immunol*. 5:256-262 (1993) y Plükthun, *Immunol. Revs*., 130:151-188 (1992).

En otro modo de realización, se pueden aislar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo a partir de colecciones de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al*., *Nature* 348:552-554 (1990). Clackson *et al*., *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks *et al*., *J. Mol. Biol*. 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando colecciones de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante barajado de cadenas (Marks *et al*., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como una estrategia para construir colecciones de fagos muy grandes (Waterhouse *et al*., *Nuc. Acids. Res*. 21:2265-

2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

También se puede modificar el ADN, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al*., *Proc. Natl Acad. Sci*. *USA* 81:6851 (1984)) o uniendo de forma covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido distinto a inmunoglobulina.

Típicamente, dichos polipéptidos distintos a inmunoglobulina se sustituyen con los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen con los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un sitio de combinación de antígeno que tenga especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tenga especificidad por un antígeno diferente.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el anticuerpo es IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal IgG.

(ii) Anticuerpos humanizados

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. En algunos modos de realización, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácido no humanos se denominan a menudo residuos de “importación”, que se toman típicamente de un dominio variable de “importación”. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y sus colaboradores (Jones *et al*., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al*., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al*., *Science* 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la colección de secuencias de dominio variable humanas conocidas. A continuación, se acepta la secuencia humana que es la más próxima a la del roedor como la región estructural (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al*., *J. Immunol*. 151:2296 (1993); Chothia *et al*., *J. Mol. Biol*. 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena ligera o pesada. Se puede usar la misma región estructural para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); Presta *et al*., *J. Immunol*. 151:2623 (1993)).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, en algunos modos de realización de los procedimientos, se preparan los anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y se conocen por los expertos en la técnica. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar y combinar residuos de FR a partir de las secuencias de receptor y de importación, de manera que se logre la característica del anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada por el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directa y más sustancialmente implicados en la influencia en la unión a antígeno.

(iii) Anticuerpos humanos

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. De forma alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras su inmunización, puedan producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la deleción homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (J_H) de anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de estirpe

germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la micromatriz genética de inmunoglobulina de estirpe germinal humana a dichos ratones mutantes de estirpe germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits *et al*., *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al*., *Year in Immuno*. 7:33 (1993); las patentes de EE. UU. n.os 5.591.669; 5.589.369; y 5.545.807.

De forma alternativa, se puede usar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty *et al*., *Nature* 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro* a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpo se clonan sin cambio de pauta de lectura en un gen de polipéptido de la cápside mayor o bien menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcional en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson *et al*., *Nature* 352:624-628 (1991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos antioxazolona a partir de una pequeña colección combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos con respecto a una matriz diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks *et al*., *J. Mol. Biol*. 222:581-597 (1991) o Griffith *et al*, *EMBO J*. 12:725-734 (1993). Véanse también las patentes de EE. UU. n.os 5.565.332 y 5.573.905.

Los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de EE. UU. 5.567.610 y 5.229.275).

(iv) Fragmentos de anticuerpo

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al*., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan *et al*., *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, se pueden aislar los fragmentos de anticuerpo de las colecciones de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. De forma alternativa, se pueden recuperar directamente los fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter *et al*., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos $F(ab')_2$ del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la materia. En otros modos de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; la patente de EE. UU. n.º 5.571.894 y la patente de EE. UU. n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

En algunos modos de realización, se proporcionan fragmentos de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el fragmento de anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno. En algunos modos de realización, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento $F(ab')_2$, un scFv, un Fv y un diacuerpo.

(v) Anticuerpos biespecíficos

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítopos diferentes. De forma alternativa, se puede combinar un brazo de unión de anticuerpo biespecífico con un brazo que se una a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2 o CD3) o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

En la técnica se conocen procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al*., *Nature* 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza normalmente mediante

etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos de producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al*., *EMBO J*., 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. En algunos modos de realización, la fusión es con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En algunos modos de realización, la primera región constante de la cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones con la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en modos de realización cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son de particular importancia.

En algunos modos de realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones indeseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera de separación fácil. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para obtener más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al*., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.731.168, se puede genomanipular la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. En algunos modos de realización, la interfase comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales indeseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o “heteroconjugados”. Por ejemplo, se puede acoplar uno de los anticuerpos en el heteroconjugado a avidina, el otro a biotina. Por ejemplo, se han propuesto dichos anticuerpos para dirigir células del sistema inmunitario a células indeseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados se conocen bien en la técnica y se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

En la literatura también se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al*., *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente que forma complejos con ditiol arsenito de sodio para estabilizar los ditioles vecinos y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Se pueden usar los anticuerpos biespecíficos producidos como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar directamente fragmentos de anticuerpo biespecífico del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al*., *J. Immunol*. 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de las cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de “diacuerpos” descrita por Hollinger *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a que los dominios V_H y V_L de

un fragmento se apareen con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al*., *J. Immunol*. 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al*., *J. Immunol*. 147: 60 (1991).

(v) Anticuerpos multivalentes

En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos multivalentes. Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más deprisa que un anticuerpo bivalente por una célula que exprese un antígeno al que se unan los anticuerpos. Los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptido del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferente comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En esta situación, el anticuerpo comprende una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno de extremo amínico con respecto a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferente en el presente documento comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptido (y preferentemente dos cadenas de polipéptido), en el que la(s) cadena(s) de polipéptido comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptido pueden comprender VD1-(X1)n-VD2-(X2) n-Fc, en las que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptido de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptido puede(n) comprender: VH-CH1-conector flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento preferentemente comprende además al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de la cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de la cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de la cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico. Los ejemplos de anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada (V_H) y un dominio variable de la cadena ligera (V_L), donde la unidad V_HV_L tiene especificidad poliepitópica, anticuerpos que tienen dos o más dominios V_L y V_H uniéndose cada unidad V_HV_L a un epítopo diferente, anticuerpos que tienen dos o más dominios variables únicos, uniéndose cada dominio variable único a un epítopo diferente, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos biespecíficos, triacuerpos, anticuerpos trifuncionales, fragmentos de anticuerpo que se han enlazado de forma covalente o no covalente. En algunos modos de realización, ese anticuerpo tiene especificidad poliepitópica; por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente a dos o más epítopos diferentes en la(s) misma(s) o diferente(s) diana(s). En algunos modos de realización, los anticuerpos son monoespecíficos; por ejemplo, un anticuerpo que solo se une a un epítopo. De acuerdo con un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo IgG que se une a cada epítopo con una afinidad de 5 µM a 0,001 pM, de 3 µM a 0,001 pM, de 1 µM a 0,001 pM, de 0,5 µM a 0,001 pM o de 0,1 µM a 0,001 pM.

(vi) Otras modificaciones de los anticuerpos

Puede ser deseable modificar el anticuerpo proporcionado en el presente documento con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad celular dependiente de antígenos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr introduciendo una o más sustituciones de aminoácido en una región Fc del anticuerpo. De forma alternativa o adicional, se puede(n) introducir (un) residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado así puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una destrucción celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementadas. Véase Caron *et al*., *J. Exp Med*. 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J., *Immunol*. 148:2918-2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando agentes de reticulación heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al*., *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). De forma alternativa, se puede genomanipular un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles y, de este modo, pueda tener una lisis mediada por el complemento potenciada y capacidades de ADCC. Véase Stevenson *et al*., *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

Para incrementar la semivida en suero del anticuerpo, se pueden realizar alteraciones de aminoácido en el anticuerpo como se describe en el documento US 2006/0067930.

(B) Variantes y modificaciones de los polipéptidos

Se puede(n) usar la(s) modificación/modificaciones de los polipéptidos, incluyendo anticuerpos, descritos en el presente documento en los procedimientos de purificación de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) descritos en el presente documento.

(i) Polipéptidos variantes

"Variante de polipéptido" significa un polipéptido, preferentemente un polipéptido activo, como se define en el presente documento, que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia natural de longitud completa del polipéptido, una secuencia de polipéptido que carece del péptido señal, un dominio extracelular de un polipéptido, con o sin el péptido señal. Dichas variantes de polipéptido incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden o delecionan uno o más residuos de aminoácido en el extremo N o C de la secuencia de aminoácidos natural de longitud completa. Habitualmente, una variante de polipéptido TAT tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, de forma alternativa, al menos aproximadamente cualquiera de un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de polipéptido de secuencia natural de longitud completa, una secuencia de polipéptido que carece del péptido señal, un dominio extracelular de un polipéptido, con o sin el péptido señal. Opcionalmente, los polipéptidos variantes no tendrán más de una sustitución de aminoácido conservadora en comparación con la secuencia de polipéptido natural, de forma alternativa, no más de aproximadamente cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácido conservadoras en comparación con la secuencia de polipéptido natural.

El polipéptido variante se puede truncar en el extremo N o en el extremo C, o puede carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se compara con un polipéptido natural de longitud completa. Determinados polipéptidos variantes pueden carecer de residuos de aminoácido que no sean esenciales para una actividad biológica deseada. Se pueden preparar estos polipéptidos variantes con truncamientos, deleciones e inserciones mediante cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Los polipéptidos variantes deseados se pueden sintetizar químicamente. Otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ácido nucleico que codifique un polipéptido variante deseado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ácido nucleico se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los polipéptidos variantes comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido natural divulgado en el presente documento.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácido únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del polipéptido. Las variantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos en las secuencias de aminoácidos del polipéptido. Se realiza cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácido también pueden alterar los procesos postraduccionales del polipéptido (por ejemplo, anticuerpo), tales como el cambio del número o posición de los sitios de glucosilación.

Se pueden encontrar directrices para determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o delecionar sin afectar negativamente a la actividad deseada comparando la secuencia del polipéptido con la de moléculas de polipéptido conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de homología alta.

Un procedimiento útil para la identificación de determinados residuos o regiones del polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) que sean localizaciones preferentes para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells, *Science* 244:1081-1085 (1989). Aquí, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) se identifica y remplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferentemente alanina o polialanina) para que afecten a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Esas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan, a continuación, introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación *per se* esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el funcionamiento de una mutación en un sitio dado, se realiza una mutagénesis aleatoria o por barrido de

Ala en el codón o región diana y se criban las variantes de anticuerpo expresadas para determinar la actividad deseada.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en FR. En la tabla 2 a continuación se muestran sustituciones conservadoras bajo el encabezamiento de “sustituciones preferentes”. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, se pueden introducir, a continuación, cambios más sustanciales, denominados “sustituciones ejemplares” en la tabla 2, o como se describe adicionalmente a continuación con referencia a las clases de aminoácidos, y cribar los productos.

Tabla 2.

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del polipéptido seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, *Biochemistry* segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H)

De forma alternativa, los residuos naturales se pueden dividir en grupos en base a propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también se puede sustituir, en general, con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación anómala. Por el contrario, se puede(n) añadir (un) enlace(s) de cisteína al polipéptido para mejorar su estabilidad (en particular, si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo de variante de sustitución preferente en particular implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo original a partir del que se generan. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica la maduración de la afinidad usando presentación en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácido en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas así se presentan de una forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetadas en cada partícula. A continuación, se criban las variantes de presentación en fagos para determinar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. A fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar mutagénesis por barrido de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión a antígeno. De forma alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y la diana. Dichos residuos de contacto y residuos cercanos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para su desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácidos del polipéptido altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. El polipéptido puede comprender restos distintos a aminoácidos. Por ejemplo, se puede glucosilar el polipéptido. Dicha glucosilación se puede producir de forma natural durante la expresión del polipéptido en la célula huésped u organismo huésped, o puede ser una modificación intencional que surja de la intervención humana. Por alteración se entiende delecionar uno o más restos glucídicos encontrados en el polipéptido y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el polipéptido.

La glucosilación del polipéptido es típicamente con enlace N o bien con enlace O. Con enlace N se refiere al acoplamiento del resto glucídico a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para el acoplamiento enzimático del resto glucídico a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación con enlace O se refiere al acoplamiento de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al polipéptido se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glucosilación con enlace N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o sustitución con, uno o más residuos de serina o treonina con respecto a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación con enlace O).

Se puede conseguir la retirada de los restos glucídicos presentes en el polipéptido química o enzimáticamente o mediante sustitución por mutación de codones que codifican residuos de aminoácido que sirven como dianas para la glucosilación. Se puede lograr la escisión enzimática de restos glucídicos en polipéptidos mediante el uso de una variedad de endo y exoglucosidasas.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo con respecto a los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos α-amino de las cadenas laterales de

lisina, arginina e histidina, la acetilación de la amina N terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C terminal.

(ii) Polipéptidos quiméricos

El polipéptido descrito en el presente documento se puede modificar de manera que forme moléculas quiméricas que comprendan el polipéptido fusionado a otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, una molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido con un polipéptido de marca que proporciona un epítopo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo antimarca. La marca de epítopo se dispone, en general, en el extremo amínico o carboxílico del polipéptido. La presencia de dichas formas con marca de epítopo del polipéptido se puede detectar usando un anticuerpo frente al polipéptido de marca. Además, la provisión de la marca de epítopo posibilita que el polipéptido se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo antimarca u otro tipo de matriz de afinidad que se una a la marca de epítopo.

En un modo de realización alternativo, la molécula quimérica puede comprender una fusión del polipéptido con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Una forma bivalente de la molécula quimérica se denomina “inmunoadhesina”.

Como se usa en el presente documento, el término “inmunoadhesina” designa moléculas similares a anticuerpo que combinan la especificidad de unión de un polipéptido heterólogo con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento de y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga”), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina es típicamente una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. Se puede obtener la secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

Las fusiones con Ig incluyen preferentemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembranario delecionado o inactivado) de un polipéptido en lugar de al menos una región variable en una molécula de Ig. En un modo de realización preferente en particular, la fusión con inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH_2 y CH_3, o la bisagra, CH_1, CH_2 y CH_3 de una molécula de IgG1.

(iii) Conjugados de polipéptido

El polipéptido para uso en formulaciones de polipéptido se puede conjugar con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterápico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina activa enzimáticamente de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Se pueden usar agentes quimioterápicos útiles en la generación de dichos conjugados. Además, las toxinas activas enzimáticamente y fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Una variedad de radionúclidos está disponible para la producción de polipéptidos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y y ^{186}Re. Los conjugados del polipéptido y agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bisazido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bisdiazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bisactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al*., *Science* 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al polipéptido.

Los conjugados de un polipéptido y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como calicheamicina, maitansinoides, un tricoteno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez a partir del arbusto africano *Maytenus serrata*. Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol. También se contemplan maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo. Existen muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados polipéptido-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los divulgados en la pat. de

EE. UU. n.º 5.208.020. Los grupos de unión incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles con respecto a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles con respecto a peptidasas o grupos lábiles con respecto a esterasas, como se divulgan en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferentes los grupos disulfuro y tioéter.

El conector se puede acoplar a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, se puede formar un enlace éster mediante reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción se puede producir en la posición C-3, que tiene un grupo hidroxilo, en la posición C-14, modificada con hidroximetilo, en la posición C-15, modificada con un grupo hidroxilo, y en la posición C-20, que tiene un grupo hidroxilo. En un modo de realización preferente, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Otro conjugado de interés comprende un polipéptido conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. Los antibióticos de la familia de calicheamicina pueden producir roturas en el ADN bicatenario en concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de calicheamicina, véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 5.712.374. Los análogos estructurales de calicheamicina que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, γ_1^I, α_2^I, α_3^I, N-acetil-γ_1^I, PSAG y θ_1^I. Otro fármaco antitumoral con el que se puede conjugar el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto calicheamicina como QFA tienen sitios de acción intracelulares y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por el polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

Otros agentes antitumorales con los que se pueden conjugar los polipéptidos descritos en el presente documento incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288, así como esperamicinas.

En algunos modos de realización, el polipéptido puede ser un conjugado entre un polipéptido y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desoxirribonucleasa, DNasa).

Aún en otro modo de realización, se puede conjugar el polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) con un “receptor” (tal como estreptavidina) para su utilización en la selección como diana previa de tumores, en el que se administra el conjugado polipéptido-receptor al paciente, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente de aclaramiento y, a continuación, la administración de un “ligando” (por ejemplo, avidina), que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionúclido).

En algunos modos de realización, se puede conjugar el polipéptido con una enzima de activación de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterápico peptidílico) en un antineoplásico activo. El componente enzimático del inmunoconjugado incluye cualquier enzima que pueda actuar sobre un profármaco de tal manera que lo convierta en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina, útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa, útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa, útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el antineoplásico, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que escinden hidratos de carbono, tales como β-galactosidasa y neuraminidasa, útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β-lactamasa, útil para convertir fármacos derivatizados con β-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amínicos con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. De forma alternativa, se pueden usar anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como “abzimas”, para convertir los profármacos en fármacos activos libres.

(iv) Otras

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido comprende enlazar el polipéptido a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El polipéptido también se puede atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización en interfase (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical *Sciences*, 18.ª edición, Gennaro, A.R., Ed., (1990).

IV. Obtención de polipéptidos para su uso en las formulaciones y procedimientos

Los polipéptidos usados en los procedimientos de análisis descritos en el presente documento se pueden obtener usando procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo los procedimientos de recombinación. Las siguientes secciones proporcionan directrices con respecto a estos procedimientos.

(A) Polinucleótidos

"Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN.

Se pueden obtener polinucleótidos que codifican polipéptidos a partir de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitarse a, una colección de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm del polipéptido y lo expresa a un nivel detectable. En consecuencia, se pueden obtener convenientemente polinucleótidos que codifican polipéptidos a partir de una colección de ADNc preparada a partir de tejido humano. También se puede obtener el gen que codifica el polipéptido a partir de una colección genómica o mediante procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

Por ejemplo, el polinucleótido puede codificar toda una cadena de molécula de inmunoglobulina, tal como una cadena ligera o una cadena pesada. Una cadena pesada completa no solo incluye una región variable de la cadena pesada (V_H), sino también una región constante de la cadena pesada (C_H), que típicamente comprenderá tres dominios constantes: C_H1, C_H2 y C_H3 y una región "bisagra". En algunas situaciones, es deseable la presencia de una región constante.

Otros polipéptidos que se pueden codificar por el polinucleótido incluyen fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, tales como anticuerpos de dominio único ("dAb"), Fv, scFv, Fab' y $F(ab')_2$ y "minicuerpos". Los minicuerpos son (típicamente) fragmentos de anticuerpo bivalente a partir de los que se ha extraído el dominio C_H1 y C_K o C_L. Como los minicuerpos son más pequeños que los anticuerpos convencionales, deberían lograr una mejor penetración en el tejido en el uso clínico/diagnóstico, aunque al ser bivalentes deberían retener una afinidad de unión más alta que los fragmentos de anticuerpo monovalentes, tales como dAb. En consecuencia, a menos que el contexto lo indique de otro modo, el término "anticuerpo" como se usa en el presente documento no solo engloba moléculas de anticuerpo entero, sino también fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno del tipo analizado anteriormente. Preferentemente, cada región estructural presente en el polipéptido codificado comprenderá al menos una sustitución de aminoácido con respecto a la región estructural aceptora humana correspondiente. Por tanto, por ejemplo, las regiones estructurales pueden comprender, en total, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácido con respecto a las regiones estructurales aceptoras.

VI. Modos de realización ejemplares

1. Un procedimiento para identificar una condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima para analizar una pluralidad de composiciones, en los que cada composición comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, comprendiendo el procedimiento a) representar una curva de carga neta frente al pH en una temperatura seleccionada basada en la composición de aminoácidos de los polipéptidos de dos o más de las composiciones y b) determinar el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH en o cerca de pH neutro determinando la segunda derivada de las representaciones de la etapa a); en el que la condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima es un pH en aproximadamente un punto de inflexión común para los polipéptidos de una o más de las composiciones.

2. El procedimiento del modo de realización 1, en el que si la carga neta en el punto de inflexión es positiva, se usa un material de intercambio catiónico para la cromatografía de intercambio iónico.

3. El procedimiento del modo de realización 2, en el que el material de cromatografía de intercambio catiónico es un material de cromatografía sulfonado o un material de cromatografía carboxilado.

4. El procedimiento del modo de realización 1, en el que si la carga neta en el punto de inflexión es negativa, se usa un material de intercambio aniónico para la cromatografía.

5. El procedimiento del modo de realización 4, en el que el material de cromatografía de intercambio aniónico es un material de cromatografía de amina cuaternaria o un material de cromatografía de amina terciaria.

6. El procedimiento del modo de realización 1, en el que se usa un material de cromatografía en modo mixto para la cromatografía.

7. El procedimiento del modo de realización 6, en el que el material de intercambio iónico en modo mixto es una mezcla de material de cromatografía sulfonado o material de cromatografía carboxilado y un material de cromatografía de amina cuaternaria o material de cromatografía de amina terciaria rellenados secuencialmente.

8. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-7, que comprende además c) determinar el cambio en el pH en el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH con un cambio en la temperatura (dPI/dT) para los polipéptidos de dos o más de las composiciones, d) seleccionar un tampón para su uso en cromatografía, en el que un cambio en la constante de disociación ácida del tampón con un cambio en la temperatura (dpKa/dT) es esencialmente el mismo que el dPI/dT de los polipéptidos.

9. El procedimiento del modo de realización 8, en el que el tampón proporciona una capacidad tamponadora eficaz en el pH en el punto de inflexión.

10. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-9, en el que el dPI/dT de los polipéptidos de una o más de las composiciones es de aproximadamente -0,02 unidades de pH.

11. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-10, en el que el cambio en la temperatura es de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 70 ºC.

12. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-11, en el que el cambio en la temperatura es de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 50 ºC.

13. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 8-12, en el que dpKa/dT = dPI/dT ± 50 %.

14. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 8-13, en el que la carga neta del polipéptido en el tampón seleccionado en la etapa d) cambia en menos de 0,5 por encima de 30 ºC.

15. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 8-14, en el que se usa el tampón seleccionado en la etapa d) en cromatografía a una concentración que varía de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 250 mM.

16. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-15, en el que las composiciones tampón comprenden además una sal.

17. El procedimiento del modo de realización 16, en el que la sal es NaCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$ o Na_2SO_4.

18. El procedimiento del modo de realización 16 o 17, en el que la concentración de la sal varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1 M.

19. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-18, en el que el polipéptido es un anticuerpo o inmunoadhesina o fragmento de los mismos.

20. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-19, en el que el polipéptido es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo.

21. El procedimiento del modo de realización 19 o 20, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.

22. El procedimiento del modo de realización 19 o 20, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

23. El procedimiento del modo de realización 19 o 20, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

24. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 19-23, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

25. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-14, en el que el contaminante es una variante del polipéptido.

26. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-25, en el que el contaminante es un producto de degradación del polipéptido.

27. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-26, en el que el contaminante es una variante con carga del polipéptido.

28. Un procedimiento para identificar una condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima para analizar una composición que comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, comprendiendo el procedimiento a) representar una curva de carga neta frente al pH en una temperatura seleccionada basada en la composición de aminoácidos del polipéptido y b) determinar el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH en o cerca de pH neutro determinando la segunda derivada de las representaciones de la etapa a); en el que la condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima es un pH en aproximadamente el punto de inflexión para el polipéptido.

29. El procedimiento del modo de realización 28, en el que si la carga neta en el punto de inflexión es positiva, se usa un material de intercambio catiónico para la cromatografía de intercambio iónico.

30. El procedimiento del modo de realización 29, en el que el material de cromatografía de intercambio catiónico es un material de cromatografía sulfonado o un material de cromatografía carboxilado.

31. El procedimiento del modo de realización 28, en el que si la carga neta en el punto de inflexión es negativa, se usa un material de intercambio aniónico para la cromatografía.

32. El procedimiento del modo de realización 31, en el que el material de cromatografía de intercambio aniónico es un material de cromatografía de amina cuaternaria o un material de cromatografía de amina terciaria.

33. El procedimiento del modo de realización 28, en el que se usa un material de cromatografía en modo mixto para la cromatografía.

34. El procedimiento del modo de realización 33, en el que el material de intercambio iónico en modo mixto es una mezcla de material de cromatografía sulfonado o material de cromatografía carboxilado y un material de cromatografía de amina cuaternaria o material de cromatografía de amina terciaria rellenados secuencialmente.

35. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 28-34, que comprende además c) determinar el cambio en el pH en el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH con un cambio en la temperatura (dPI/dT) para el polipéptido, d) seleccionar un tampón para su uso en cromatografía, en el que un cambio en la constante de disociación ácida del tampón con un cambio en la temperatura (dpKa/dT) es esencialmente el mismo que el dPI/dT del polipéptido.

36. El procedimiento del modo de realización 35, en el que el tampón proporciona una capacidad tamponadora eficaz en el pH en el punto de inflexión.

37. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 28-36, en el que el dPI/dT de los polipéptidos de una o más de las composiciones es de aproximadamente -0,02 unidades de pH.

38. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 28-37, en el que el cambio en la temperatura es de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 70 ºC.

39. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 28-38, en el que el cambio en la temperatura es de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 50 ºC.

40. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 28-39, en el que dPI/dT = dpKa/dT ± 50 %.

41. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 28-40, en el que la carga neta del polipéptido en el tampón seleccionado en la etapa d) cambia en menos de 0,5 por encima de 30 ºC.

42. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 28-41, en el que se usa el tampón seleccionado en la etapa d) en cromatografía a una concentración que varía de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM.

43. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 28-42, en el que la composición tampón comprende además una sal.

44. El procedimiento del modo de realización 43, en el que la sal es NaCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$ o Na_2SO_4.

45. El procedimiento del modo de realización 43 o 44, en el que la concentración de la sal varía de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M.

46. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 28-45, en el que el polipéptido es un anticuerpo o inmunoadhesina o fragmento de los mismos.

47. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 28-46, en el que el polipéptido es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo.

48. El procedimiento del modo de realización 46 o 47, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.

49. El procedimiento del modo de realización 46 o 47, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

50. El procedimiento del modo de realización 46 o 47, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

51. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 38-50, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

52. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 28-51, en el que el contaminante es una variante del polipéptido.

53. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 28-52, en el que el contaminante es un producto de degradación del polipéptido.

54. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 28-53, en el que el contaminante es una variante con carga del polipéptido.

55. Un procedimiento para analizar una composición, en el que la composición comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, en el que el procedimiento separa eficazmente los polipéptidos de los contaminantes, comprendiendo el procedimiento a) determinar las condiciones de pH y temperatura de separación por intercambio iónico óptimas para una pluralidad de composiciones, comprendiendo cada composición un polipéptido diana y uno o más contaminantes de acuerdo con el procedimiento del modo de realización 1, b) unir el polipéptido y uno o más contaminantes de la composición a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga, en el que el tampón de carga comprende un tampón identificado mediante el procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 8-15; c) eluir el polipéptido y uno o más contaminantes del material de cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente de un tampón de elución, en el que el tampón de elución comprende el tampón y una sal, en el que se incrementa la concentración de la sal en un gradiente con el tiempo, en el que el polipéptido y el uno o más contaminantes se separan mediante el gradiente; y d) detectar el polipéptido y el uno o más contaminantes.

56. Un procedimiento para analizar una composición que comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, en el que el procedimiento separa eficazmente el polipéptido de los contaminantes, comprendiendo el procedimiento a) unir el polipéptido y uno o más contaminantes a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga, en el que el tampón de carga comprende un tampón, y en el que se han optimizado el pH y la temperatura de la cromatografía para una pluralidad de polipéptidos diana i) representando una curva de carga neta frente al pH en una temperatura seleccionada, en el que la curva se basa en la composición de aminoácidos de los polipéptidos de dos o más polipéptidos diana, y ii) determinando el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH determinando la segunda derivada de las representaciones de la etapa i); en el que la condición de cromatografía de intercambio iónico óptima es un pH en un punto de inflexión común para dos o más polipéptidos diana; b) eluir el polipéptido y uno o más contaminantes del material de cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente de un tampón de elución, en el que el tampón de elución comprende el tampón y una sal, en el que el polipéptido y el uno o más contaminantes se separan mediante el gradiente; y c) detectar el polipéptido y el uno o más contaminantes.

57. El procedimiento del modo de realización 56, en el que la temperatura seleccionada es la temperatura ambiente.

58. El procedimiento del modo de realización 56 o 57, en el que el tampón se identifica a) determinando el cambio en el pH en el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH con un cambio en la temperatura (dPI/dT) para los dos o más polipéptidos diana, b) seleccionando un tampón para el que un cambio en la constante de disociación ácida del tampón con un cambio en la temperatura (dpKa/dT) es esencialmente el mismo que el dPI/dT del uno o más polipéptidos diana con puntos de inflexión comunes.

59. El procedimiento del modo de realización 58, en el que el tampón proporciona una capacidad tamponadora eficaz en el pH en el punto de inflexión.

60. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 55-59, en el que la concentración del tampón varía de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM.

61. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 55-60, en el que el pH del tampón varía de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5 en un intervalo de temperatura de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 70 ºC.

62. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 55-62, en el que el pH del tampón varía de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5 en un intervalo de temperatura de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 50 ºC.

63. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 55-62, en el que el pH del tampón y el polipéptido en el punto de inflexión es de aproximadamente 7,8 a aproximadamente 22 ºC, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 37 ºC o de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 50 ºC.

64. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 55-63, en el que el gradiente salino es un gradiente lineal.

65. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 55-64, en el que el gradiente salino es un gradiente escalonado.

66. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 55-65, en el que el gradiente salino es un gradiente de NaCl, un gradiente de KCl, $(NH_4)_2SO_4$ o un gradiente de Na_2SO_4.

67. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 55-66, en el que la concentración de sal en el gradiente se incrementa de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 1 M.

68. El procedimiento del modo de realización 67, en el que la concentración de sal se incrementa de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 100 mM en aproximadamente 100 minutos.

69. El procedimiento del modo de realización 67, en el que la concentración de sal se incrementa de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 80 mM en aproximadamente 40 minutos.

70. El procedimiento del modo de realización de uno cualquiera de los modos de realización 55-69, en el que el polipéptido es un anticuerpo o inmunoadhesina o fragmento de los mismos.

71. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 55-70, en el que el polipéptido es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo.

72. El procedimiento del modo de realización 70 o 71, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.

73. El procedimiento del modo de realización 70 o 71, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

74. El procedimiento del modo de realización 70 o 71, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

75. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 70-74, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

76. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 55-75, en el que el contaminante es una variante del polipéptido.

77. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 55-76, en el que el contaminante es un producto de degradación del polipéptido.

78. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 55-77, en el que el contaminante es una variante con carga del polipéptido.

79. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 55-78, en el que el material de cromatografía es un material de cromatografía de intercambio catiónico.

80. El procedimiento del modo de realización 79, en el que el material de cromatografía de intercambio catiónico es un material de cromatografía sulfonado o un material de cromatografía carboxilado.

81. Un procedimiento para analizar una pluralidad de composiciones de polipéptido, en el que cada composición de polipéptido comprende un polipéptido y una o más variantes con carga del polipéptido, en el que el procedimiento separa eficazmente el polipéptido de sus variantes con carga; para cada composición de polipéptido el procedimiento comprende, a) unir el polipéptido y una o más variantes con carga a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga a un caudal de aproximadamente 1 ml/minuto, en el que el tampón de carga comprende un tampón HEPES 10 mM a aproximadamente pH 7,6 a aproximadamente 40 ºC; b) eluir el polipéptido y las variantes con carga contaminantes del material de cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente de un tampón de elución, en el que el tampón de elución comprende aproximadamente tampón HEPES 10 mM a aproximadamente pH 7,6 y NaCl, en el que la concentración del NaCl se incrementa en el gradiente de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 80 mM en aproximadamente 40 minutos, en el que el polipéptido y sus variantes con carga se separan mediante el gradiente; y c) detectar el polipéptido y la una o más variantes con carga.

82. El procedimiento del modo de realización 81, en el que la pluralidad de composiciones de polipéptido comprende polipéptidos diferentes.

83. El procedimiento del modo de realización 81 u 82, en el que la pluralidad de composiciones de polipéptido comprende polipéptidos con pI diferentes.

84. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 81-83, en el que las composiciones de polipéptido son composiciones de anticuerpo.

Todos los rasgos característicos divulgados en esta memoria descriptiva se pueden combinar en cualquier combinación. Cada rasgo característico divulgado en esta memoria descriptiva se puede reemplazar por un rasgo característico alternativo que cumpla un propósito igual, equivalente o similar. Por tanto, a menos que se establezca expresamente de otro modo, cada rasgo característico divulgado es solo un ejemplo de una serie genérica de rasgos característicos equivalentes o similares.

Se ilustran más detalles de la invención por los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Los ejemplos a continuación pretenden ser puramente ejemplares de la invención y, por lo tanto, no se debe considerar que limitan la invención de ningún modo. Se aportan los siguientes ejemplos y descripción detallada a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Materiales y procedimientos para los ejemplos

Se usaron los siguientes materiales y procedimientos para los ejemplos, a menos que se señale de otro modo.

Materiales

Todos los mAb se fabricaron usando líneas de células de ovario de hámster chino (CHO) o células de *Escherichia coli* estables.

Las columnas MabPac SCS-10 y Propac WCX-10 se adquirieron de ThermoFisher. Las columnas AntiBodix fueron de Sepax. Las columnas YMC se adquirieron de YMC. Trisma (Tris) se obtuvieron de Mallinckrodt Baker Inc. o Sigma (St. Louis, MO), y HEPES, ACES, base Trizma y CAPS se obtuvieron de Sigma. El cloruro de sodio, hidróxido de sodio (10 N) y ácido clorhídrico (12 N) se obtuvieron de Mallinckrodt Baker Inc. El ácido fosfórico (85 %) se obtuvo de EMD Millipore.

Configuración de la HPLC

Los experimentos de cromatografía de intercambio catiónico se realizaron principalmente en un instrumento de cromatografía de líquidos Waters 2796 BioAlliance, en un sistema de HPLC Agilient 1200SL o en una CL de separación rápida cuaternaria UltiMate 3000 (Thermo Scientific Dionex). El instrumento incluía una bomba de gradiente cuaternaria de baja presión o una bomba binaria, un automuestreador con capacidad de controlar la temperatura, un compartimento de columna térmico para un control de temperatura preciso y un detector UV de haz de diodos y de doble longitud de onda. Se realizaron el control de instrumentos, la adquisición de datos y el análisis de datos con el programa informático Dionex Chromeleon, versión 6.8.

Ejemplo 1. Optimización de la cromatografía de intercambio iónico analítica de múltiples productos.

Para desarrollar una IEC de múltiples productos de alta resolución y sólida para detectar contaminantes, tales como variantes con carga, se diseñaron las condiciones de tal manera que los mAb estuvieran en equilibrio de carga. Se determinó el equilibrio de carga para una serie de productos de mAb representando mediante un gráfico el estado de carga neta (z) frente al pH. La condición en la que un mAb está en equilibrio se obtuvo ajustando la 2.ª derivada de la ecuación para la línea de z a pH igual a 0.

La carga neta de un mAb a un pH dado se determinó en base al contenido de seis aminoácidos en el mAb que desempeñan un papel importante en la definición de las características dependientes del pH de una proteína en virtud de sus cadenas laterales. Los seis aminoácidos son asparagina, ácido glutámico, histidina, tirosina, lisina y arginina. Se usaron las constantes de disociación ácida de los seis aminoácidos (pKa, definida como $-\log_{10}Ka$) para calcular el estado de carga neta (z). Por ejemplo, MAb1 tiene 10 residuos de histidina. La figura 2 muestra la protonación de histidina como una función del pH. A valores de pH por debajo de la pKa de la histidina de 6,02, la histidina está protonada y tiene una carga positiva (figura 2A). A valores de pH por encima de 6,02, la histidina está desprotonada y no tiene carga. Usando la ecuación 1, se determinó la probabilidad de un estado de carga particular para histidina a un pH particular. La figura 2B muestra la probable distribución de histidina desprotonada en mAb1 a pH 6,5 y a pH 7,5. A pH 6,5, mAb1 tenía una mediana de 8 residuos de histidina desprotonados, mientras que a pH 7,5 prácticamente todos los residuos de histidina estaban desprotonados. La figura 2C muestra un ejemplo con cuatro moléculas de polipéptido, cada una con dos residuos de histidina. En la pKa (pH 6,02), un 50 % de los residuos de His están protonados y un 50 % están desprotonados. La combinación del estado de carga de los

residuos de histidina en estas cuatro moléculas es una distribución binomial en la pKa: una con ambas histidinas protonadas; dos con una histidina protonada y otra desprotonada; y una con ambas histidinas desprotonadas.

Se determinó la probabilidad del estado de carga más abundante para un pH dado para cada uno de los seis aminoácidos y se determinó la probabilidad ponderada de carga de mAb1 a un pH dado en base al número de residuos de cada uno de estos seis aminoácidos presentes en el anticuerpo (figura 3). También se puede determinar la distribución de la frecuencia de carga por medio de la entropía de Shannon, que es una medida de la incertidumbre en una variable aleatoria (ecuación 3). En base al número de residuos de cada uno de estos seis aminoácidos presentes en mAb1 (tabla 3), se representa la entropía de Shannon a un pH dado para mAb1 en la figura 4. Cuanto más baja sea la entropía de Shannon, más homogénea es la distribución de carga.

Tabla 3. Número de residuos de aminoácidos seleccionados en mAb1

pH	lisina	histidina	aspartato	glutamato	tirosina	arginina
N.º de residuos	90	28	52	64	66	32

A partir de estos datos, se representó la distribución de la carga neta de mAb1 como una función del pH (figura 5) y se determinó que el punto de inflexión fue de pH 7,5 a 37 °C (figura 6, que es la vista en planta de la figura 5). Obsérvese que este es el pH con el estado de carga más homogéneo, mostrado como los picos más altos y más agudos en la figura 5. El estado de carga más homogéneo también dará como resultado el pico más agudo en la separación por IEC.

Usando el procedimiento descrito anteriormente, se determinaron los puntos de inflexión para una serie de mAb con pI que variaban desde 7,6 a 9,4 (figura 7). Sorprendentemente, el punto de inflexión para prácticamente todos los mAb fue el mismo, pH 7,5, a 37 °C. Seleccionar como diana el PI puede mejorar la solidez en cuanto al pH de la IEC. Como se muestra en la figura 7, la carga neta varía poco para todos los anticuerpos entre pH 7 y pH 8.

Se determinaron los puntos de inflexión para los mAb como 22 °C, 37 °C y 50 °C. Como se muestra en la figura 8, aunque los puntos de inflexión eran dependientes de la temperatura, los puntos de inflexión para todos los anticuerpos sometidos a prueba fueron similares en una temperatura dada.

Se determinó el punto de inflexión para mAb2 para temperaturas que variaban desde 22 °C a 50 °C. Como se observa en la figura 9, mientras que el pH en el punto de inflexión disminuye con el incremento de la temperatura, la carga neta permanece constante. Por lo tanto, la optimización de la cromatografía para el punto de inflexión también proporciona la solidez del procedimiento de IEX frente a la fluctuación de la temperatura. El término dPI/dT representa el cambio en el PI de una molécula con un cambio en la temperatura. A partir de estos resultados, se puede elegir un tampón óptimo donde el cambio en la constante de disociación ácida del tampón como una función de la temperatura se acerque a dPI/dT (es decir, dPI/dT ≈ dpKa/dT) para minimizar el efecto de la temperatura y mejorar la solidez del ensayo.

Se representó la relación entre el pH en el punto de inflexión y la temperatura y se calcularon la pendiente de la regresión lineal, los valores de dPI/dT, para una serie de mAb con diferentes valores de pI (figura 10 y tabla 4). Se descubrió que los valores de dPI/dT para estos seis mAb son esencialmente los mismos (-0,0177 a -0,0183). Como tal, un tampón con un valor de dpKa/dT de aproximadamente -0,018 sería óptimo para un análisis por IEC de todos los mAb presentados en la figura 10 y, por lo tanto, óptimo para una IEC de múltiples productos.

Tabla 4. Puntos de inflexión (pH)

Temp. °C	MAb27	MAb1	MAb2	MAb4	MAb5	MAb6	MAb8
25	7,69	7,73	7,72	7,72	7,75	7,72	7,72
30	7,60	7,64	7,63	7,62	7,66	7,62	7,62
35	7,50	7,54	7,54	7,53	7,56	7,53	7,53
37	7,47	7,51	7,50	7,49	7,53	7,49	7,49
40	7,42	7,45	7,45	7,44	7,47	7,44	7,44
45	7,33	7,37	7,36	7,35	7,39	7,35	7,35
50	7,25	7,28	7,27	7,26	7,30	7,27	7,27
dPI/dT	-0,0177	-0,018	-0,018	-0,0183	-0,018	-0,018	-0,018

Los valores publicados del cambio en pKa como una función de la temperatura (dpKa/dT) para una serie de tampones son como sigue:

Fosfato: -0,0028

HEPES: -0,014

ACES: -0,02

Tris: -0,028

Bicina: -0,018

Tricina: -0,021

TAPS: -0,02

CHES: -0,018

Véase Benyon, RJ y Easterby, JS, Buffer Solutions The Basics, IRE Press, 1996.

La figura 11 muestra un gráfico de la carga neta en el punto de inflexión de mAb2 en tampón fosfato, tampón HEPES, tampón ACES y tampón Tris como una función de la temperatura. Los gráficos de la carga neta de mAb2 en tampón ACES o tampón HEPES fueron prácticamente planos, cambiando en menos de 0,5 por encima de un intervalo de 30 °C. Por otro lado, los gráficos para Tris y fosfato no fueron tan planos, mostrando un mayor cambio en la carga neta con un cambio en la temperatura. Se llegó a la conclusión de que ACES o HEPES son tampones óptimos para un análisis por IEC de múltiples productos.

Ejemplo 2. Desarrollo de un protocolo para IEC de múltiples productos.

Se desarrolló un protocolo para IEC de múltiples productos en vista del punto de inflexión y se determinaron la relación del valor de dpKa/dT para ACES y HEPES y los valores de dPI/dT para una serie de mAb. Se sometieron a prueba 19 mAb. Las muestras de mAb se diluyeron a 1 mg/ml con tampón A y se mantuvieron a 5±3 °C en el automuestreador. Se dispuso la columna MabPac SCX-10 de 4 × 250 mm en el compartimento de columna con el ajuste de temperatura a 37±1 °C. Para cada desarrollo cromatográfico, se inyectaron 10 µl de proteína (20 µg). El tampón A fue ACES 5 mM pH 7,5 a 37 ºC. El tampón B fue NaCl 180 mM en el tampón A. El gradiente fue NaCl 0-100 mM en 100 min a 1 mM/min mezclando el tampón B en el tampón A. El caudal fue de 0,8 ml/min. La proteína se detectó mediante absorbancia a 280 nm. Como se muestra en la figura 12, la IEC de múltiples productos proporcionó una buena resolución para una amplia gama de productos de mAb.

Ejemplo 3. Solidez en cuanto al pH de la IEC de múltiples productos

Se examinó la solidez en cuanto al pH de la IEC de múltiples productos usando el procedimiento descrito en el ejemplo 2, excepto porque el gradiente fue NaCl 1,5 mM/min y a tres valores de pH diferentes, pH 7,3, pH 7,5 y pH 7,7. Se usó mAb4 como un anticuerpo ejemplar no limitante para este estudio.

Como se muestra en la figura 13, se observó una buena resolución entre el pico principal del anticuerpo y sus variantes con carga en todos los valores de pH sometidos a prueba. La cuantificación de las áreas de pico no reveló cambios significativos en el análisis con respecto al pH (tabla 5).

Tabla 5. Solidez en cuanto al pH de la IEC de múltiples productos

						Resolución[a]	
pH	**% ácida**	**% de pico principal**	**% básica 1**	**% básica 2**	**Básica total**	**Principal/VB1**	**VB1/VB2**
7,7	8,4	52,1	21,1	18,4	39,5	2,3	2,2
7,5	8,4	53,3	21,0	18,3	39,3	2,3	2,3
7,3	8,6	52,4	21,3	17,7	39,0	3,0	2,7

[a]Resolución definida por la ecuación 4.

Ecuación 4 $$R = \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{1/2(w_1 + w_2)},$$

donde R es la resolución

t_{r1} y t_{r2} son los tiempos de retención de los dos picos inmediatamente adyacentes

w_1 y w_2 son los anchos de pico de los dos picos inmediatamente adyacentes

Ejemplo 4. Solidez en cuanto a la temperatura

Se examinó la solidez en cuanto a la temperatura de la IEC de múltiples productos usando el procedimiento descrito en el ejemplo 2, excepto porque el gradiente fue NaCl 1,5 mM/min y en tres temperaturas diferentes, 32 °C, 37 °C y 42 °C. Se usaron mAb2, mAb6 y mAb10 como anticuerpos ejemplares no limitantes para este estudio.

Como se muestra en la figura 14, se observó una buena resolución entre los anticuerpos y sus variantes con carga en todas las temperaturas sometidas a prueba para cada uno de los anticuerpos. Se observaron cromatogramas prácticamente idénticos con cada temperatura para cada anticuerpo.

En un segundo experimento, se sometieron a prueba los mAb 19, 7 y 8 para determinar la solidez en cuanto a la temperatura en tampón HEPES 10 mM. Como se observa en la figura 15, se observó una buena resolución entre los anticuerpos y sus variantes con carga en todas las temperaturas sometidas a prueba para cada uno de los anticuerpos. La cuantificación de las áreas de pico no reveló cambios significativos en el análisis con respecto a la temperatura.

Tabla 6. Solidez en cuanto a la temperatura de la IEC de múltiples productos

mAb	**Temp.**	**% ácida**	**% de pico principal**	**% básica 1**	**Resolución ácida**	**Resolución básica**
mAb19	42 °C	16,46	75,62	7,92	1,51	3,20
	37 °C	16,69	74,65	8,56	1,53	3,26
	32 °C	15,97	76,17	7,86	1,62	3,30
mAb7	42 °C	18,95	67,30	13,75	1,31	na
	37 °C	19,80	67,28	12,92	1,36	na
	32 °C	18,53	68,80	12,66	1,45	na
mAb8	42 °C	22,20	68,78	9,03	2,21	1,72
	37 °C	22,44	67,67	9,89	2,25	1,45
	32 °C	22,60	67,25	10,15	2,33	1,35

Ejemplo 5. Comparación de IEC de múltiples productos con IEC específica de producto.

La IEC de múltiples productos se comparó con los procedimientos de IEC específica de producto desarrollados para mAb8, mAb25 y mAb26. Se realizó la IEC de mAb8, mAb28 y mAb26 usando el procedimiento de IEC de múltiples productos descrito en el ejemplo 2, excepto por el gradiente de NaCl 1,5 mM/min [Genentech, por favor, confírmese]. El tampón y la temperatura para los procedimientos específicos de producto fueron diferentes. Para mAb8, fue MES 20 mM, pH 6,5 a 30 ºC; para mAb25, fue HEPES 20 mM, pH 7,6 a 42 ºC; y para mAb26 fue ACES 20 mM, pH 7,1 a 40 °C. Como se puede ver en la figura 16, la IEC de múltiples productos (paneles de la izquierda) obtuvo resultados similares o con mejor resolución que los procedimientos de IEC específica de producto (paneles de la derecha).

Ejemplo 6. Uso de IEC de múltiples productos con columnas diferentes

Se usó la IEC de múltiples productos para la selección de la columna de cromatografía. Se sometió a prueba mAb8 en cuatro columnas de intercambio catiónico diferentes usando los procedimientos descritos en el ejemplo 2, excepto porque el gradiente fue NaCl 1,5 mM/min. Las columnas sometidas a prueba fueron ProPac WCX-10, 4 × 250, 10 µm; YMC, 4,6 × 100, 5 µm; Antibodix NP5, 4,6 × 250, 5 µm; y MabPac SCX-10, 4 × 250, 10 µm (usada en el ejemplo 2). Como se puede ver en la figura 17, las cuatro columnas dieron como resultado una resolución adecuada. La cuantificación de las áreas de pico y resoluciones entre el pico ácido y el pico básico con el pico principal se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Cribado de columnas para mAb8

Columna	**% ácida**	**% de pico principal**	**% básica 1**	**Resolución ácida**	**Resolución básica**
ProPac WCX-10	19,80	66,98	13,22	2,06	1,42
YMC	25,21	64,86	9,93	1,78	0,93
AntiBodix NP5	23,23	66,10	10,67	0,99	0,22
MabPac SCX-10	14,80	73,38	11,83	2,81	2,54

Ejemplo 7. Escalabilidad

Se evaluó el uso de las columnas de cromatografía de intercambio catiónico con tamaños diferentes para su uso en la IEC de múltiples productos. Una longitud de columna reducida dará como resultado tiempos de desarrollo más

cortos. Se sometió a cromatografía mAb8 en columnas ProPac WCX-10 de tres tamaños diferentes usando el procedimiento de IEC de múltiples productos descrito en el ejemplo 2. Como las columnas tenían tamaños diferentes, los desarrollos cromatográficos fueron durante diferentes periodos de tiempo. Los tamaños de las columnas y los tiempos de desarrollo respectivos fueron como sigue: 4 × 250 mm durante 63 min, 4 × 100 mm durante 19 min y 4 × 50 mm durante 15 min. Los resultados se presentan en la figura 18. Aunque se pierde algo de resolución con columnas más cortas, se obtiene una separación adecuada con resultados cuantitativos consistentes con la columna más corta para una aplicación de alto rendimiento. La cuantificación de las áreas de pico es consistente y se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Escalabilidad de IEC de múltiples productos

Tamaño de columna	**Tiempo de desarrollo**	**% ácida**	**% de pico principal**	**% básica 1**	**Resolución ácida**	**Resolución básica**
4 × 250	63 min	22,44	67,67	9,89	2,25	1,45
4 × 100	19 min	24,72	65,85	9,42	1,66	0,85
4 × 50	15 min	23,22	67,03	9,75	1,51	0,65

Ejemplo 8. Solidez del ensayo

La validación de un procedimiento de prueba requiere que el procedimiento sea adecuadamente sólido. Un enfoque de diseño de experimentos (DoE) para evaluar la solidez evalúa exhaustivamente los efectos de escasas variaciones en las condiciones del ensayo, incluyendo los efectos interactivos. Se seleccionaron las condiciones multivariantes específicas de cada experimento para combinar factores con el potencial de interacción. Los factores que no se podían variar continuamente, pero se sabe que tienen efectos, es decir, columnas (por ejemplo, variabilidad de lote a lote, edad) e instrumentos (por ejemplo, dos tipos de modelos), se examinaron con procedimientos de un factor a la vez. Se determinaron los efectos comparando la variabilidad de respuestas en las condiciones diana con la variabilidad de respuestas en las condiciones variables de acuerdo con el diseño factorial.

Diseño experimental

Lo que sigue describe las condiciones de intercambio iónico usadas para monitorizar la heterogeneidad de carga de proteínas de anticuerpo monoclonal recombinantes para el enfoque de control de procedimiento con plataforma. El objetivo de este estudio fue investigar la solidez del ensayo usando un diseño de experimentos Plackett-Burman de seis factores (tablas 9 y 10). Los factores examinados fueron el pH del disolvente, la concentración final de sal, la temperatura de columna, el caudal, el volumen de inyección y la molalidad del tampón. Las variables de respuesta para este estudio incluyeron el porcentaje relativo de pico principal y de variantes ácidas y básicas. Se realizaron un total de 21 desarrollos, 12 en condiciones factoriales y 9 desarrollos en la diana.

Tabla 13

Parámetros variables							
N.º de inyección	**Patrón**	**pH**	**Molaridad del tampón (mM)**	**Volumen de inyección (µl)**	**Temperatura (ºC)**	**Caudal (ml/min)**	**Gradiente final NaCl (mM)**
1	Diana	7,50	5,0	25	40	1,50	90
2	(+---+-)	7,65	4,7	22	37	1,53	85
3	(+-+++-)	7,65	4,7	28	43	1,53	85
4	Diana	7,50	5,0	25	40	1,50	90
5	(--+--+)	7,35	4,7	28	37	1,47	95
6	Diana	7,50	5,0	25	40	1,50	90
7	(+++---)	7,65	5,3	28	37	1,47	85
8	Diana	7,50	5,0	25	40	1,50	90
9	(-+++--)	7,35	5,3	28	43	1,47	85
10	(-+--+-)	7,35	5,3	22	37	1,47	85
11	Diana	7,50	5,0	25	40	1,50	90
12	(-+-+++)	7,35	5,3	22	43	1,53	95
13	Diana	7,50	5,0	25	40	1,50	90
14	(++---+)	7,65	5,3	22	37	1,47	95
15	Diana	7,50	5,0	25	40	1,50	90
16	(+--+-+)	7,65	4,7	22	43	1,47	95
17	Diana	7,50	5,0	25	40	1,50	90
18	(--+-++)	7,35	4,7	28	37	1,53	95

19	(---+--)	7,35	4,7	22	43	1,47	85
20	Diana	7,50	5,0	25	40	1,50	90
21	(++++++)	7,65	5,3	28	43	1,53	95

Tabla 10

Resultados			
Patrón	**% ácida**	**% principal**	**% básica**
Diana	16,72	58,38	24,89
(+---+-)	16,37	57,79	25,84
(+-+++-)	16,44	57,84	25,72
Diana	16,54	58,34	25,12
(--+--+)	16,22	59,20	24,58
Diana	16,58	58,44	24,98
(+++---)	16,60	58,58	24,81
Diana	16,57	58,86	24,57
(-+++--)	16,29	59,37	24,33
(-+--+-)	16,12	59,36	24,52
Diana	16,34	58,45	25,20
(-+-+++)	15,97	58,82	25,21
Diana	16,70	58,16	25,14
(-++---+)	16,62	57,94	25,44
Diana	16,63	58,79	24,58
(+--+-+)	16,34	58,71	24,95
Diana	16,54	59,05	24,41
(--+-++)	16,29	59,47	24,24
(---+--)	16,21	59,32	24,48
Diana	16,46	58,32	25,22
(++++++)	16,40	58,64	24,96

Tabla 11. Tabla resumen en cuanto a la solidez

Estudios	Condiciones	Resultados
Parámetros multivariantes: Disolventes A y B, pH, Molalidad del tampón (mM), Temp. de columna (°C), Caudal (ml/min), Volumen de inyección (µl), Conc. de sal (mM)	Diseño multivariante para evaluar Disolventes A y B, pH de 7,5 ± 0,15 Molalidad del tampón 5 ± 0,3 mM Temp. de columna 40 ° ± 3 °C Caudal 1,50 ± 0,03 ml/min Volumen de inyección 25 ± 3 µg Conc. de sal 90 ± 3 mM	Sin efecto significativo. Valores de DER de un 1,2 %, 0,9 % y 1,8 % en todos los parámetros de IEC para áreas de pico en porcentaje de pico principal, regiones ácidas y básicas, respectivamente.
Variabilidad entre lotes de columnas y de instrumento a instrumento	2 instrumentos (1 HPLC y 1 UPLC), 2 columnas de lotes de resina diferentes, analista único	Sin efecto significativo. Valores de DER de un 0,9 %, 1,0 % y 2,3 % de dos instrumentos y cinco cartuchos para áreas de pico en porcentaje de pico principal, regiones ácidas y básicas, respectivamente.

Análisis estadístico

La muestra de valores de respuesta diana presenta la variabilidad que se produce cuando todos los factores variables se encuentran en condiciones diana. La muestra de valores de respuesta factoriales presenta la variabilidad que se produce cuando se varían múltiples factores en combinación.

Tabla 12

Condiciones diana; (n=9)				Condiciones factoriales; (n=11)		
	% ácida	% de pico principal	% básica	% ácida	% de pico principal	% básica

Promedio	16,5	58,5	24,9	16,3	58,6	24,8
DE	0,1	0,3	0,3	0,2	0,6	0,5
% de DER	0,70 %	0,50 %	1,23 %	1,13 %	1,06 %	2,16 %

Se calcularon la media, desviación estándar (DE) y desviación estándar relativa (DER) para todos los valores de respuesta diana y factoriales de DoE. Aunque se observan escasas diferencias entre las DE y las DER de las isoformas en las condiciones diana y en las condiciones factoriales, nunca han sido tan bajas. Los resultados se muestran en las figuras 19-21.

Típicamente, para una validación de una IEC, los límites de % de DER aceptables son: < 5 % para el pico principal, < 10 % para las variantes ácidas y básicas.

Todas las condiciones factoriales producen resultados para el % de pico principal y % básica que están en un intervalo de tolerancia de un 95/99 calculado a partir de los resultados en las condiciones diana.

Dos condiciones factoriales, n.º 10 (-+--+-) y n.º 12 (-+-+++), produjeron valores de % de variante ácida por debajo del requerimiento de un IT de un 95/99 bajo calculado a partir de los resultados en las condiciones diana. Todas las demás condiciones factoriales produjeron valores en el intervalo.

Las condiciones que produjeron valores fuera de un IT de un 95/99 en las condiciones diana son una consecuencia del alto nivel de precisión en el ensayo y la variabilidad no controlada limitada (instrumentos y columna) en el estudio de DoE.

Un IT de un 95/99 normal para IEC puede estar en un intervalo de un 3-5 % para el pico principal y las variantes ácidas y básicas.

Materiales y procedimientos

Para cuantificar las variantes cargadas de una sustancia farmacéutica, especialidad farmacéutica o material de toxicología de proteína o anticuerpo para productos clínicos usando el enfoque de control de procedimiento con plataforma (PMC). El enfoque de control de procedimiento con plataforma utiliza un anticuerpo representativo como control de procedimiento para la determinación de la idoneidad del sistema en este procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico de múltiples productos. Este procedimiento de prueba de múltiples productos es aplicable a moléculas de proteína con una carga neta positiva (a aproximadamente pI > 7,2).

Equipo y Material

1.1 Sistema de HPLC: Waters UPLC H-Class Bio con UV ajustable (TUV); Waters Alliance 2695 con detector Waters 2487 y Waters Alliance e2695 con detector Waters 2489 UV/Vis o equivalente.

1.2 Detector UV en línea que pueda monitorizar a 280 nm.

1.3 La HPLC debe contener un compartimento de columna que pueda mantener la temperatura en el punto de ajuste ± 2 °C.

1.4 Integrador electrónico o sistema de ordenador que pueda obtener la integración de área de pico.

1.5 Automuestreador que pueda enfriar a 2-8 °C.

1.6 Columna: ThermoFisher MabPacR SCX-10, 10 µm, 4 250 mm (Thermo, producto n.º 074625).

1.7 Medidor de pH con compensación de temperatura.

1.8 Baño de agua que pueda calentar a 37 ± 2 °C.

1.9 Termómetros calibrados con divisiones de 1 °C y especificados para su uso con inmersión parcial en baños de agua.

Reactivos

OBSERVACIÓN: Las recetas son para cantidades nominales de reactivo y se pueden ajustar proporcionalmente de acuerdo con los requerimientos del ensayo.

2.1 Agua purificada, adecuada para análisis por HPLC (Super-Q o equivalente)

2.2 Disolvente A: Tampón HEPES 5 mM, pH 7,5 ± 0,1

HEPES, ácido libre, calidad de reactivo (FW 238.3, Corning CellGro; producto n.º 61-034-RO), 1,87 g

HEPES, sal de sodio, calidad de reactivo (FW 260.3, SigmaAldrich; producto n.º H3784), 1,87 g

Agua purificada c.s.p. 3 l

Combinar los productos químicos enumerados en una probeta graduada con aproximadamente 2900 ml de agua purificada. Agitar hasta que se disuelva. C.s.p. 3 l con agua purificada y medir el pH. Verificar que el pH sea de 7,5 ± 0,1 a temperatura ambiente. Si el pH está fuera del intervalo especificado, desechar y repetir la preparación. Filtrar a través de una membrana de 0,2 µm.

2.3 Disolvente B: Cloruro de sodio 100 mM en disolvente A

Cloruro de sodio (FW 58.44 J. T. Baker, n.º de cat. 3624-01 o equivalente), 5,844 g de disolvente A (etapa 2.2) c.s.p. 1 l

Combinar cloruro de sodio en una probeta graduada con aproximadamente 450 ml de disolvente A y agitar hasta que se disuelva. C.s.p. 1 l con disolvente A y filtrar a través de una membrana de 0,2 m.

2.4 Disolvente C: Cloruro de sodio 1 M en disolvente A

Cloruro de sodio (FW 58.44 JT Baker, n.º de cat. 3624-01), 29,22 g

Disolvente A (etapa 2.2) c.s.p. 500 ml

Combinar cloruro de sodio en una probeta graduada con aproximadamente 450 ml de disolvente A y agitar hasta que se disuelva. C.s.p. 500 ml con disolvente A y filtrar a través de una membrana de 0,2 m.

2.5 Solución de almacenamiento de columna: Acida de sodio al 0,05 % en disolvente B, pH 7,5 ± 0,1 PRECAUCIÓN: La acida de sodio es altamente tóxica y mutagénica. Evitar inhalar el polvo y evitar el contacto con la piel (se absorbe fácilmente a través de la piel).

Acida de sodio (FW 65.01, EM Science 0066884R o equivalente), 2,25 g; disolvente B (etapa 2.2), c.s.p. 500 ml

Combinar la acida de sodio en una probeta graduada con aproximadamente 450 ml de disolvente B y agitar hasta que se disuelva. C.s.p. la solución hasta 500 ml con disolvente B y filtrar a través de una membrana de 0,22 m.

2.6 Solución de limpieza de columna y sistema: Hidróxido de sodio 0,1 N (JT Baker 5636-02), preparar según las etapas a continuación:

100 µl de NaOH 1 N

900 µl de agua purificada

Combinar los productos químicos enumerados y mezclar bien.

2.7 Tampón de formulación para muestra y patrón de referencia

2.8 Solución madre de Polisorbate 20 al 10 % (p/v)

Polisorbate 20 (Polysorbate™ 20, Sigma, cat. P7949 o equivalente) 10 g, agua purificada, c.s.p. 100 ml

Pesar el Polisorbate 20 directamente en una probeta graduada tarada. Evitar el contacto del cuello de la probeta con tensioactivo. Con cuidado c.s.p. 100 ml con agua purificada, evitando la formación de burbujas. Introducir suavemente una barra agitadora magnética en la probeta. Agitar la solución durante 15-20 minutos hasta que todo el tensioactivo se disuelva.

2.9 Tampón de formulación para control de procedimiento

Tampón de formulación para MAb8: Histidina HCl 20 mM, sacarosa 120 mM, Polisorbate 20 al 0,02 %, pH 6,0 ± 0,3

L-histidina HCl, monohidrato (FW 209.6) 2,31 g

L-histidina, base libre (FW 155.2) 1,40 g

Sacarosa (FW 342.3) 41,08 g

Polisorbate 20 0,20 g

o solución madre de Polisorbate 20 al 10 % (p/v) 2,0 ml

Agua purificada c.s.p. 1,0 l

Combinar los productos químicos enumerados con aproximadamente 800 ml de agua purificada y agitar hasta que se disuelva. Verificar que el pH sea de 6,0 ± 0,3. Si el pH está fuera del intervalo especificado, desechar y repetir la preparación. C.s.p. la solución hasta 1,0 l con agua purificada. Filtrar a través de una membrana de 0,45-?m.

2.10 5 mg/ml de carboxipeptidasa B, tratada con DFP (Roche 103233) o equivalente, actividad aproximada de 150 U/mg

2.11 1 mg/ml de CpB

5 mg/ml de carboxipeptidasa B, tratada con DFP 20 µl

Agua purificada 80 µl

Añadir con precisión los 5 mg/ml de carboxipeptidasa B en el agua purificada. Para concentraciones de carboxipeptidasa B adquirida distintas a 5 mg/ml, se pueden realizar ajustes en los volúmenes para garantizar una concentración final de 1 mg/ml. Preparación reciente.

Preparación de blancos para control de procedimiento, muestra, referencia y tampón de formulación

3.1 Control de procedimiento (MAb8), concentración nominal: 50 mg/ml

Diluir el control de procedimiento con disolvente A (etapa 2.2) hasta una concentración final de aproximadamente 2,0 mg/ml (por ejemplo, para 50 mg/ml de control de procedimiento combinar 40 µl de muestra y 960 µl de disolvente A).

3.2 Blanco para control de procedimiento

Diluir el tampón de formulación para control de procedimiento con disolvente A usando el mismo esquema de dilución que en la etapa 3.1.

3.3 Preparación de muestra y patrón de referencia

Diluir la(s) muestra(s) y el patrón de referencia a 2 mg/ml con disolvente A.

3.4 Preparación de blancos para muestra y patrón de referencia

3.4.1 Diluir el tampón de formulación para el producto usando el mismo esquema de dilución que en la etapa 3.4.

3.5 Registrar las diluciones en una hoja de datos.

3.6 Preparación de muestra con digestión con CpB Consultar la información específica e instrucciones del producto para los requerimientos de digestión con CpB

3.6.1 Realizar una adición de un 1 % (p/p) de 1 mg/ml de CpB (etapa 2.12) a los blancos diluidos para control de procedimiento, muestra(s), patrón de referencia y tampón de formulación (por ejemplo, añadir 20 l de 1 mg/ml de CpB a 1000 l de 2,0 mg/ml de muestra).

3.6.2 Mezclar en vórtex suavemente e incubar los blancos tratados con CpB para control de procedimiento, muestra(s), patrón de referencia y tampón de formulación durante 20 ± 2 minutos a 37 ± 2 °C.

3.6.3 Registrar las preparaciones en una hoja de datos.

3.7 Transferir los blancos diluidos para control de procedimiento, patrón de referencia, muestra(s) y tampón de formulación a los frascos apropiados para su análisis.

3.8 El análisis por HPLC se debe completar en 48 horas desde la preparación de muestra. La(s) muestra(s) se debe(n) almacenar a 2-8 °C antes de los análisis.

Condiciones cromatográficas

4.1 Condiciones cromatográficas comunes a ambos instrumentos de HPLC de Waters:

4.1.1 Caudal: 1,5 ml/min

4.1.2 Temperatura del automuestreador: 5 ± 3 °C

4.1.3 Temperatura de columna: 40 ± 2 °C

4.1.4 Longitud de onda de detección UV: 280 nm

4.1.5 Volumen de inyección: 25 l (~50 g)

4.2 Ajuste de instrumento para Aqcuity H-class UPLC de Waters y detectores de haz de diodos o de múltiples longitudes de onda

4.2.1 Salida analógica puesta a cero: 5 %

4.2.2 Salida analógica de atenuación: 500 mUA

4.2.3 Ajustes de lavados: Inyección con lavado de aguja (IPA al 10 %)

Preinyectar 10 s

Posinyectar 20 s

4.2.4 Velocidad de extracción y distribución: 100 µl/min

4.2.5 Aceleración 2,0 ml / min / 0,02 min (100 ml/min/min)

4.2.6 Ajustes de detector

4.2.6.1 Tasa de muestreo: 1 pt/s

4.2.6.2 Filtro: Hamming

4.2.6.3 Constante de tiempo 1,0

4.2.6.4 Proporción mínima Proporción mínima 0,00 Proporción máxima 2,00

4.2.6.5 Cero automático Canal A: (tiempo 0 y tiempo 50)

4.2.6.6 Sensibilidad: 2,000 AUFS

4.3 Ajuste de instrumento para Waters Alliance (e)2695 HPLC con detector Waters 2487

4.3.1 Volumen expulsado: 100 µl

4.3.2 Tiempo de lavado de aguja: extendido (IPA al 10 %)

4.3.3 Desgasificación de disolvente: ajustar a modo “encendido”

4.3.4 Aceleración 10,0 ml / min / 0,1 min (100 ml/min/min)

4.3.5 Velocidad de extracción y distribución: lenta (50 µl/min)

4.3.6 Ajustes de detector

4.3.6.1 Tasa de muestreo: 1 pt/s

4.3.6.2 Filtro: Hamming

4.3.6.3 Constante de tiempo 1,0

4.3.6.4 Proporción mínima 0,1000

4.3.6.5 Cero automático Canal A en tiempo 0 y tiempo 50

4.3.6.6 Sensibilidad: 2,000 UA

4.4 Gradiente:

Tabla 13

Tiempo (min)	% A	% B	% C	Caudal (ml/min)
0,0	100	0,0	0,0	1,5
3,0	100	0,0	0,0	1,5
37,0	10,0	90,0	0,0	1,5
37,1	0,0	0,0	100	1,5
40,0	0,0	0,0	100	1,5
40,1	100	0,0	0,0	1,5
50,0	100	0,0	0,0	1,5

Acondicionamiento de instrumento

5.1 Seguir el protocolo apropiado para el uso de HPLC

5.2 Cargar los conductos con ~20 ml de disolvente apropiado, incluyendo el conducto de lavado de aguja con IPA al 10 %

Limpieza y acondicionamiento de columna

6.1 Realizar lavado de sistema y columna usando el siguiente programa isocrático. Inyectar 100 µl de NaOH 0,1 N.

Tabla 14

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% de disolvente B	% de disolvente B
0	1,5	50	50
3	1,5	50	50

6.2 Repetir la etapa 6.1, al menos cinco (5) veces.

6.3 Usando el programa isocrático en la etapa 6.1, realizar una inyección única de 100 ul de disolvente A.

6.4 Equilibrar la columna en las condiciones iniciales del programa de gradiente en la etapa 4.4 (disolvente A al 100 % a 1,5 ml/min) durante ~20 minutos o hasta que se observe un valor de referencia estable.

Protocolo de inyección

7.1 Acondicionamiento: Inyectar control de procedimiento sin digestión con CpB hasta que se observen cromatogramas consistentes durante un mínimo de 2 inyecciones. La resolución de la región ácida, el pico principal y la región básica debe ser consistente mediante inspección visual con respecto a los cromatogramas típicos.

7.2 Control de procedimiento con plataforma sin digestión con CpB (inyección única)

7.3 Blanco para tampón de formulación para control de procedimiento

7.4 Patrón de referencia* (inyección única)

7.5 Muestra(s)* (inyección por duplicado)

7.6 Patrón de referencia* (inyección única)

7.7 Blanco(s) para tampón de formulación para patrón/patrones de referencia* (inyección única)

7.8 Control de procedimiento con plataforma sin digestión con CpB (inyección única)

* Con o sin CpB si el producto lo exige.

OBSERVACIONES: 1) Si los tampones de formulación difieren para el patrón de referencia y la muestra, inyectar blancos separados para el patrón de referencia y la muestra.

2) Si se necesitan más de 15 inyecciones (incluyendo los patrones de referencia y los respectivos blancos para tampón de formulación de producto) entre el control de procedimiento, cada 15 inyecciones delimitar con inyecciones de control de procedimiento. En la sección de idoneidad del sistema de la hoja de datos de prueba, informar solo de las inyecciones de control de procedimiento que delimitan la(s) muestra(s) sobre la(s) que se está informando.

3) El patrón de referencia se considera una muestra y no se usa para evaluar la idoneidad del sistema de la sesión de prueba.

Apagado y almacenamiento de columna

Almacenar la columna enjuagando la columna con al menos 30 ml de solución de almacenamiento de columna (etapa 2.4).

Idoneidad del sistema

OBSERVACIÓN: Para el control de procedimiento, determinar los puntos finales de integración superponiendo los perfiles de control de procedimiento con el blanco para tampón de formulación para control de procedimiento. Expandir los perfiles superpuestos e identificar los puntos finales de la integración comparando el blanco con los perfiles de control de procedimiento.

9.1 Integrar todos los picos atribuidos a la proteína. No incluir picos que estén presentes en los cromatogramas de blanco para tampón de formulación para control de procedimiento, a menos que el pico correspondiente en el blanco sea < 1 % del pico en el PMC.

9.2 Confirmar visualmente la consistencia de los perfiles de cromatograma de las inyecciones de control de procedimiento de delimitación entre sí y con los perfiles cromatográficos típicos. Todos los picos nombrados en los cromatogramas típicos deben estar presentes.

OBSERVACIÓN: Los perfiles de los picos nombrados pueden diferir ligeramente en la forma del pico de los perfiles de ejemplo debido a la variabilidad de la columna y de los instrumentos.

9.3 Calcular el porcentaje de pico principal, región ácida y región básica para cada inyección de control de procedimiento de delimitación.

9.4 Intervalo de idoneidad del sistema

Tabla 15. Intervalos de idoneidad del sistema aceptables para el control de procedimiento no tratado con CpB

	Región ácida	Pico principal	Región básica
Intervalo aceptable de % de área de pico	15,5 y 17,7	55,5 y 61,4	21,3 y 28,6

9.5 Registrar los resultados en la hoja de datos de idoneidad del sistema.

Análisis de datos

10.1 Comparar visualmente los perfiles para identificar los picos tanto en los cromatogramas de la muestra como del patrón de referencia.

10.2 Integrar todos los picos atribuidos a la proteína. No incluir picos que estén presentes en los cromatogramas de blanco para tampón de formulación de producto, a menos que el pico correspondiente en el blanco sea < 1 % del pico en el PMC.

OBSERVACIÓN: Para determinar los puntos finales de integración, superponer los perfiles de muestra(s) y de patrón de referencia con el blanco para tampón de formulación de producto. Expandir los perfiles superpuestos e identificar los puntos finales de la integración comparando el blanco para tampón de formulación de producto con los perfiles de muestra(s) y de patrón de referencia.

10.3 Analizar cada inyección de muestra(s) y patrón de referencia para calcular el porcentaje de área de pico del pico principal, región ácida y región básica.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar una condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima para analizar una pluralidad de composiciones, en el que cada composición comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, comprendiendo el procedimiento

a) representar una curva de carga neta frente al pH en una temperatura seleccionada basada en la composición de aminoácidos de los polipéptidos de dos o más de las composiciones, y

b) determinar el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH en o cerca de pH neutro determinando la segunda derivada de las representaciones de la etapa a);

en el que la condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima es un pH en aproximadamente un punto de inflexión común para el/los polipéptido(s) de una o más de las composiciones.

2. Un procedimiento para identificar una condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima para analizar una composición que comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, comprendiendo el procedimiento

a) representar una curva de carga neta frente al pH en una temperatura seleccionada basada en la composición de aminoácidos del polipéptido, y

b) determinar el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH en o cerca de pH neutro determinando la segunda derivada de la representación de la etapa a);

en el que la condición de separación por cromatografía de intercambio iónico óptima es un pH en aproximadamente el punto de inflexión para el polipéptido.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que si la carga neta en el punto de inflexión es positiva, se usa un material de intercambio catiónico para la cromatografía de intercambio iónico.

4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el material de cromatografía de intercambio catiónico es un material de cromatografía sulfonado o un material de cromatografía carboxilado.

5. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que si la carga neta en el punto de inflexión es negativa, se usa un material de intercambio aniónico para la cromatografía.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el material de cromatografía de intercambio aniónico es un material de cromatografía de amina cuaternaria o un material de cromatografía de amina terciaria.

7. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que se usa un material de cromatografía en modo mixto para la cromatografía.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el material de intercambio iónico en modo mixto es una mezcla de material de cromatografía sulfonado o material de cromatografía carboxilado y un material de cromatografía de amina cuaternaria o material de cromatografía de amina terciaria rellenados secuencialmente.

9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-8, que comprende además

c) determinar el cambio en el pH en el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH con un cambio en la temperatura (dPI/dT) para los polipéptidos de dos o más de las composiciones,

d) seleccionar un tampón para su uso en cromatografía, en el que un cambio en la constante de disociación ácida del tampón con un cambio en la temperatura (dpKa/dT) es esencialmente el mismo que el dPI/dT de los polipéptidos.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, que comprende además

c) determinar el cambio en el pH en el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH con un cambio en la temperatura (dPI/dT) para el polipéptido,

d) seleccionar un tampón para su uso en cromatografía, en el que un cambio en la constante de disociación ácida del tampón con un cambio en la temperatura (dpKa/dT) es esencialmente el mismo que el dPI/dT del polipéptido.

11. El procedimiento de la reivindicación 9 o 10, en el que el tampón proporciona una capacidad tamponadora eficaz en el pH en el punto de inflexión.

12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el dPI/dT de los polipéptidos de una o más de las composiciones es de aproximadamente -0,02 unidades de pH.

13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el cambio en la temperatura es

a) de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 70 ºC; y/o

b) de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 50 ºC.

14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que dpKa/dT = dPI/dT ± 50 %.

15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9-14, en el que la carga neta del polipéptido en el tampón seleccionado en la etapa d) cambia en menos de 0,5 por encima de 30 ºC.

16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9-15, en el que se usa el tampón seleccionado en la etapa d) en cromatografía a una concentración que varía de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 250 mM.

17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que las composiciones tampón comprenden además una sal.

18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que

a) la sal es NaCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$ o Na_2SO_4; y/o

b) la concentración de la sal varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1 M.

19. Un procedimiento para analizar una composición, en el que la composición comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, en el que el procedimiento separa eficazmente el polipéptido de los contaminantes, comprendiendo el procedimiento

a) determinar las condiciones de pH y temperatura de separación por intercambio iónico óptimas para una pluralidad de composiciones, comprendiendo cada composición un polipéptido diana y uno o más contaminantes de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1,

b) unir el polipéptido y uno o más contaminantes de la composición a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga, en el que el tampón de carga comprende un tampón identificado mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9-16;

c) eluir el polipéptido y uno o más contaminantes del material de cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente de un tampón de elución, en el que el tampón de elución comprende el tampón y una sal, en el que la concentración de la sal se incrementa en un gradiente con el tiempo, en el que el polipéptido y el uno o más contaminantes se separan mediante el gradiente; y

d) detectar el polipéptido y el uno o más contaminantes.

20. Un procedimiento para analizar una composición que comprende un polipéptido y uno o más contaminantes, en el que el procedimiento separa eficazmente el polipéptido de los contaminantes, comprendiendo el procedimiento

a) unir el polipéptido y uno o más contaminantes a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga, en el que el tampón de carga comprende un tampón, y en el que se han optimizado el pH y la temperatura de la cromatografía para una pluralidad de polipéptidos diana

i) representando una curva de carga neta frente al pH en una temperatura seleccionada, en el que la curva se basa en la composición de aminoácidos del polipéptido de dos o más polipéptidos diana, y

ii) determinando el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH determinando la segunda derivada de las representaciones de la etapa i);

en el que la condición de cromatografía de intercambio iónico óptima es un pH en un punto de inflexión común para dos o más polipéptidos diana;

b) eluir el polipéptido y uno o más contaminantes del material de cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente de un tampón de elución, en el que el tampón de elución comprende el tampón y una sal,

en el que el polipéptido y el uno o más contaminantes se separan mediante el gradiente; y

c) detectar el polipéptido y el uno o más contaminantes.

21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que la temperatura seleccionada es la temperatura ambiente.

22. El procedimiento de la reivindicación 20 o 21, en el que el tampón se identifica

a) determinando el cambio en el pH en el punto de inflexión de la curva de carga neta frente al pH con un cambio en la temperatura (dPI/dT) para los dos o más polipéptidos diana,

b) seleccionando un tampón para el que un cambio en la constante de disociación ácida del tampón con un cambio en la temperatura (dpKa/dT) es esencialmente el mismo que el dPI/dT del uno o más polipéptidos diana con puntos de inflexión comunes.

23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que el tampón proporciona una capacidad tamponadora eficaz en el pH en el punto de inflexión.

24. El procedimiento de la reivindicación 19 a 23, en el que el tampón es ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES) o ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES).

25. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 19-24, en el que la concentración del tampón varía de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM.

26. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 19-25, en el que el pH del tampón varía

a) de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5 en un intervalo de temperatura de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 70 ºC; y/o

b) de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5 en un intervalo de temperatura de aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 50 ºC.

27. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 19-26, en el que el pH del tampón y el polipéptido en el punto de inflexión es de aproximadamente 7,8 a aproximadamente 22 ºC, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 37 ºC o de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 50 ºC.

28. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 19-27, en el que el gradiente salino es

a) un gradiente lineal; y/o

b) un gradiente escalonado y/o

c) un gradiente de NaCl, un gradiente de KCl, gradiente de $(NH_4)_2SO_4$ o un gradiente de Na_2SO_4.

29. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 19-28, en el que la concentración de sal se incrementa en el gradiente

a) de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 1 M; o

b) de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 100 mM en aproximadamente 100 minutos; o

c) de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 80 mM en aproximadamente 40 minutos.

30. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-29, en el que el polipéptido es

a) un anticuerpo o inmunoadhesina o fragmento de los mismos; y/o

b) un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo.

31. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que el anticuerpo es

a) un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico; y/o

b) un fragmento de anticuerpo.

32. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-31, en el que el contaminante es

a) una variante del polipéptido; y/o

b) un producto de degradación del polipéptido; y/o

c) una variante con carga del polipéptido.

33. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 19-32, en el que el material de cromatografía es un material de cromatografía de intercambio catiónico.

34. El procedimiento de la reivindicación 33, en el que el material de cromatografía de intercambio catiónico es un material de cromatografía sulfonado o un material de cromatografía carboxilado.

35. Un procedimiento para analizar una pluralidad de composiciones de polipéptido, en el que cada composición de polipéptido comprende un polipéptido y una o más variantes con carga del polipéptido, en el que el procedimiento separa eficazmente el polipéptido de sus variantes con carga;

para cada composición de polipéptido el procedimiento comprende,

a) unir el polipéptido y una o más variantes con carga a un material de cromatografía de intercambio iónico usando un tampón de carga a un caudal de aproximadamente 1 ml/minuto, en el que el tampón de carga comprende tampón HEPES 10 mM a aproximadamente pH 7,6 a aproximadamente 40 ºC;

b) eluir el polipéptido y las variantes con carga contaminantes del material de cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente de un tampón de elución, en el que el tampón de elución comprende aproximadamente tampón HEPES 10 mM a aproximadamente pH 7,6 y NaCl, en el que la concentración del NaCl se incrementa en el gradiente de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 80 mM en aproximadamente 40 minutos, en el que el polipéptido y sus variantes con carga se separan mediante el gradiente; y

c) detectar el polipéptido y la una o más variantes con carga.

36. El procedimiento de la reivindicación 35, en el que la pluralidad de composiciones de polipéptido comprende polipéptidos diferentes.

37. El procedimiento de la reivindicación 35 o 36, en el que la pluralidad de composiciones de polipéptido comprende polipéptidos con pI diferentes.

38. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 35-37, en el que las composiciones de polipéptido son composiciones de anticuerpo.

Fig. 1

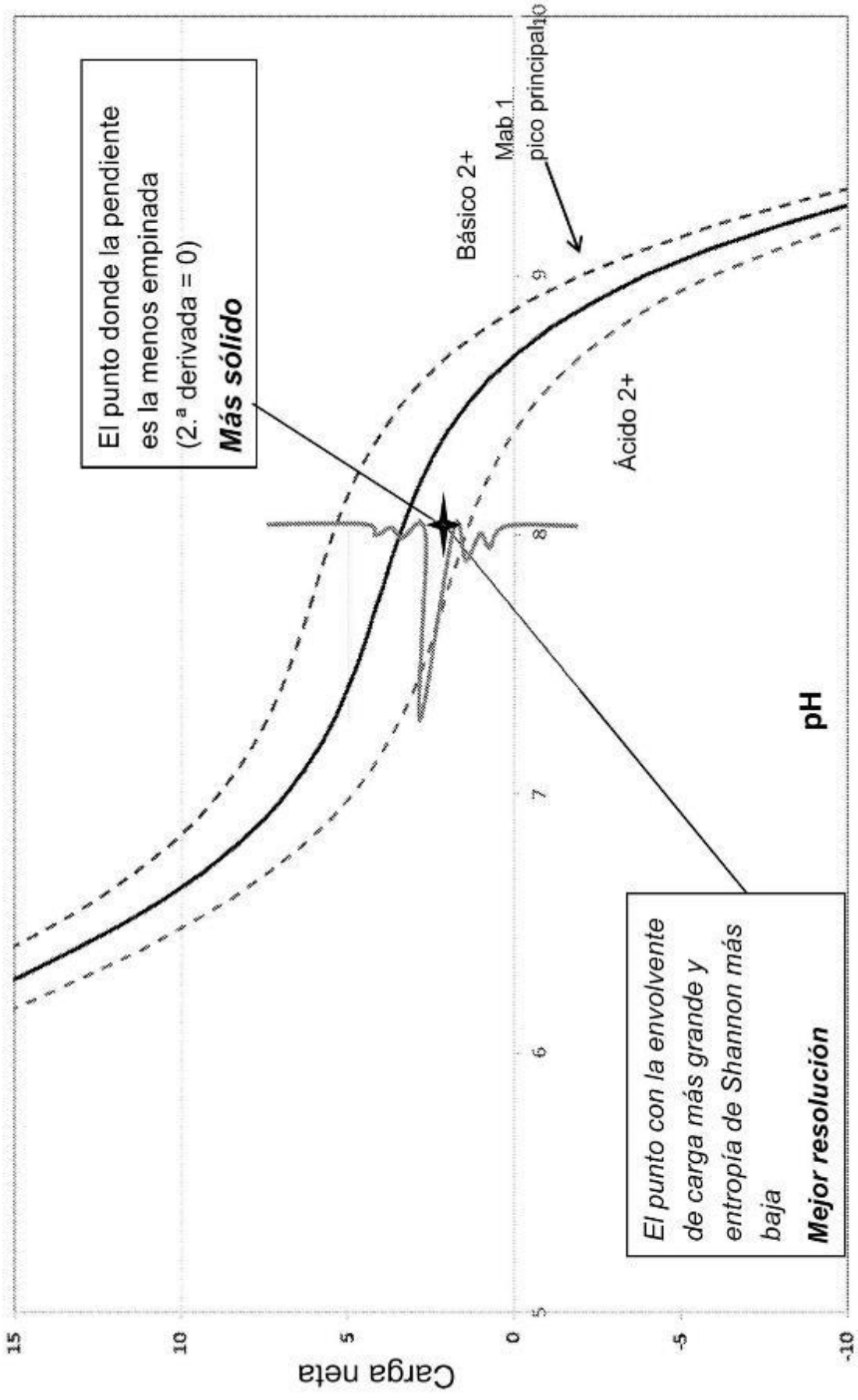
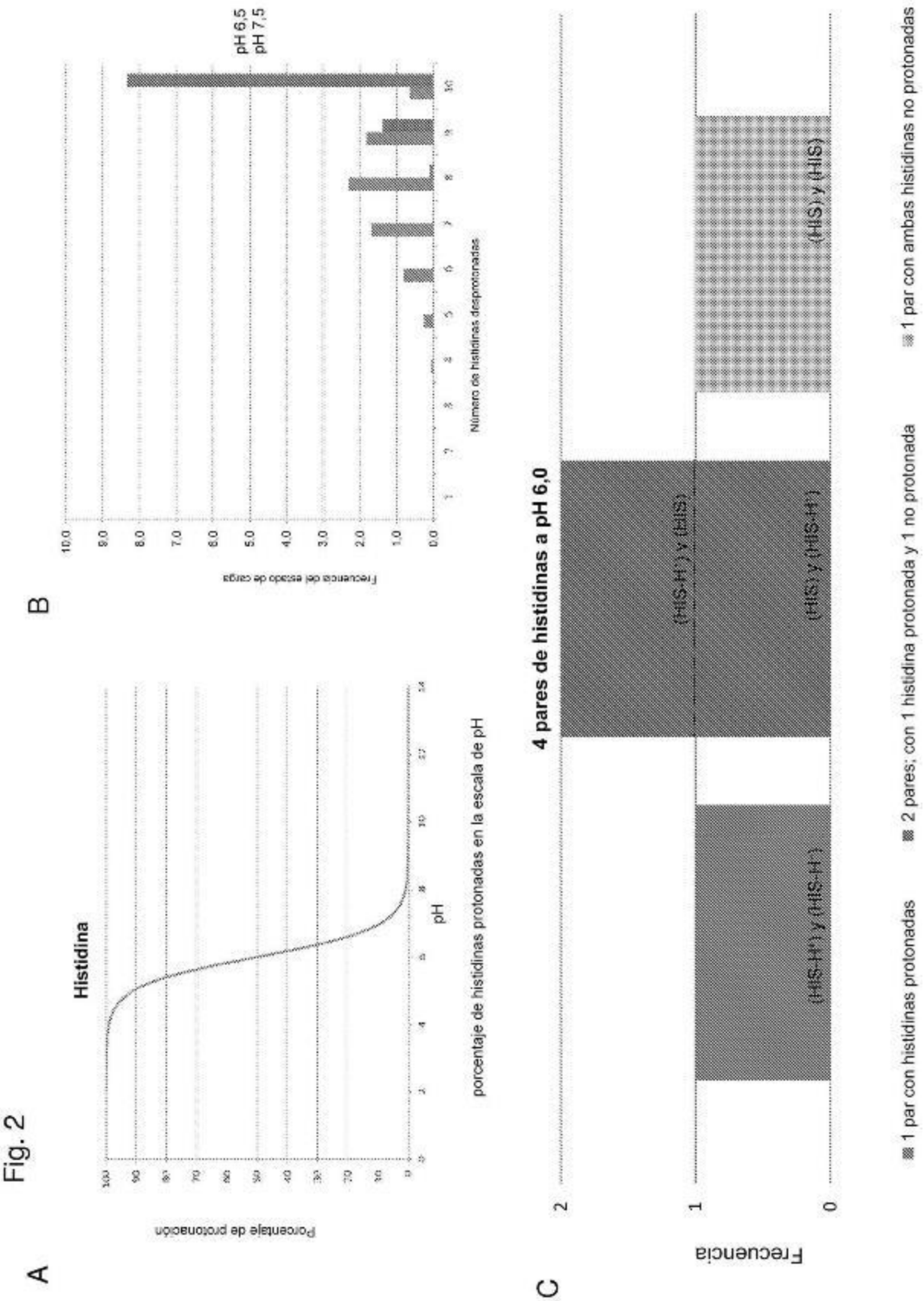

El punto donde la pendiente es la menos empinada (2.ª derivada = 0)
Más sólido
Básico 2+
Mab 1
pico principal
Ácido 2+
El punto con la envolvente de carga más grande y entropía de Shannon más baja
Mejor resolución
pH
Carga neta
15
10
5
0
-5
-10
5
6
7
8
9
10

Fig. 2


A
Histidina
Porcentaje de protonación
pH
porcentaje de histidinas protonadas en la escala de pH
B
pH 6,5
pH 7,5
Frecuencia del estado de carga
Número de histidinas desprotonadas
C
4 pares de histidinas a pH 6,0
Frecuencia
(HIS-H+) y (HIS)
(HIS-H+) y (HIS-H+)
(HIS) y (HIS)
1 par con histidinas protonadas
2 pares; con 1 histidina protonada y 1 no protonada
1 par con ambas histidinas no protonadas

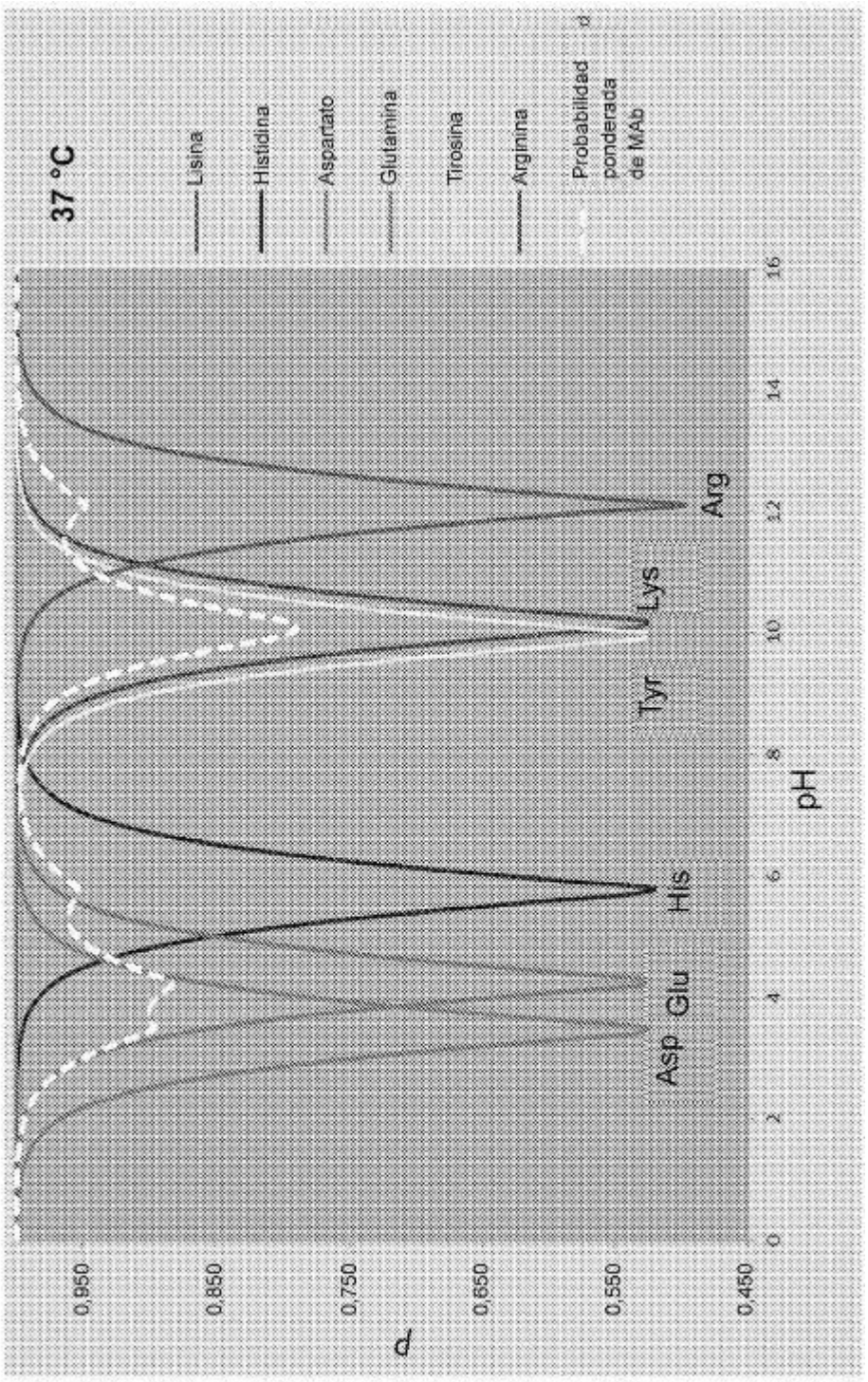

37 °C
Lisina
Histidina
Aspartato
Glutamina
Tirosina
Arginina
Probabilidad ponderada de MAb
Asp
Glu
His
Tyr
Lys
Arg
pH
0,950
0,850
0,750
0,650
0,550
0,450
0
2
4
6
8
10
12
14
16

Fig. 3

Fig. 4

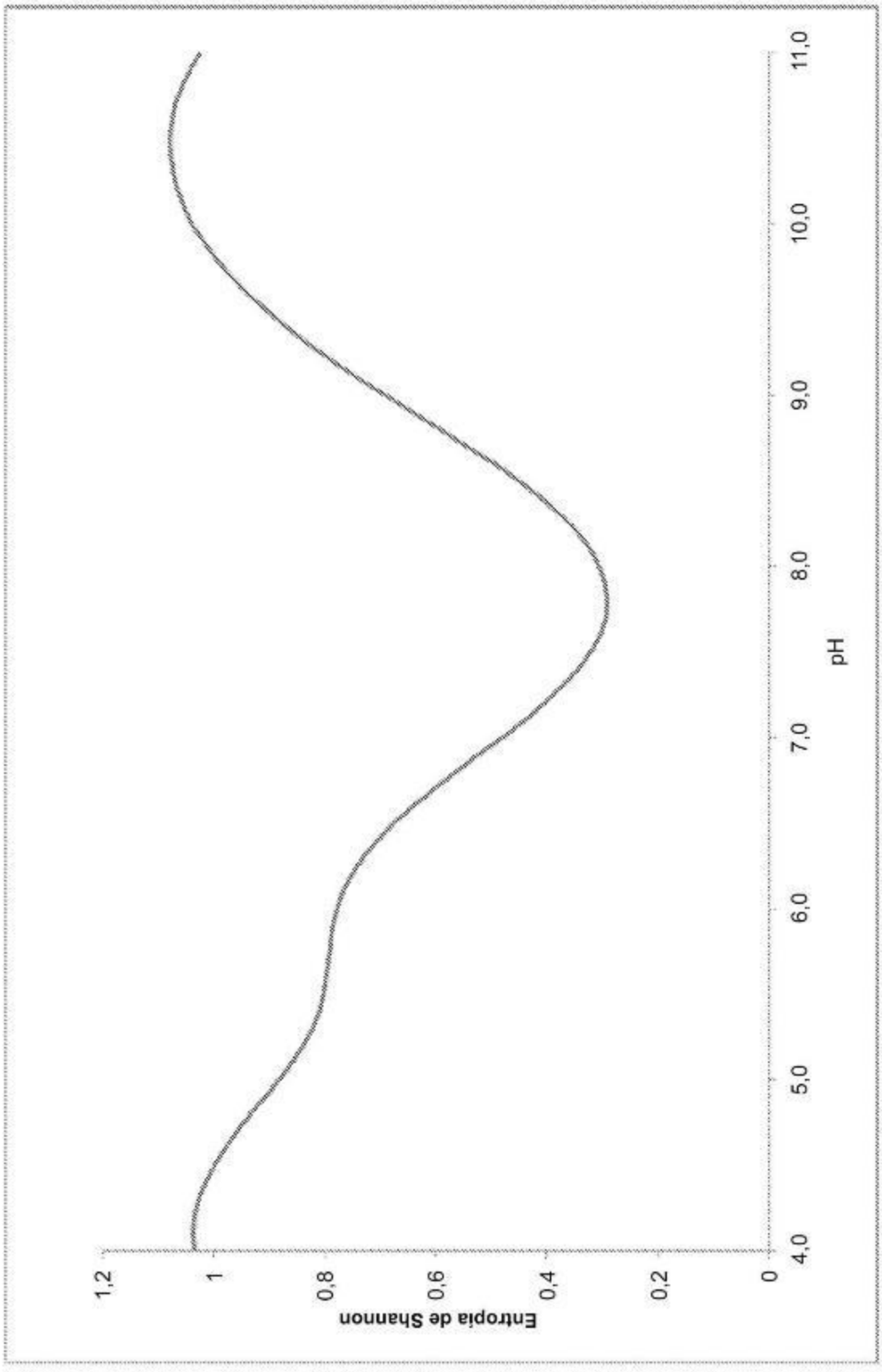


Fig. 5

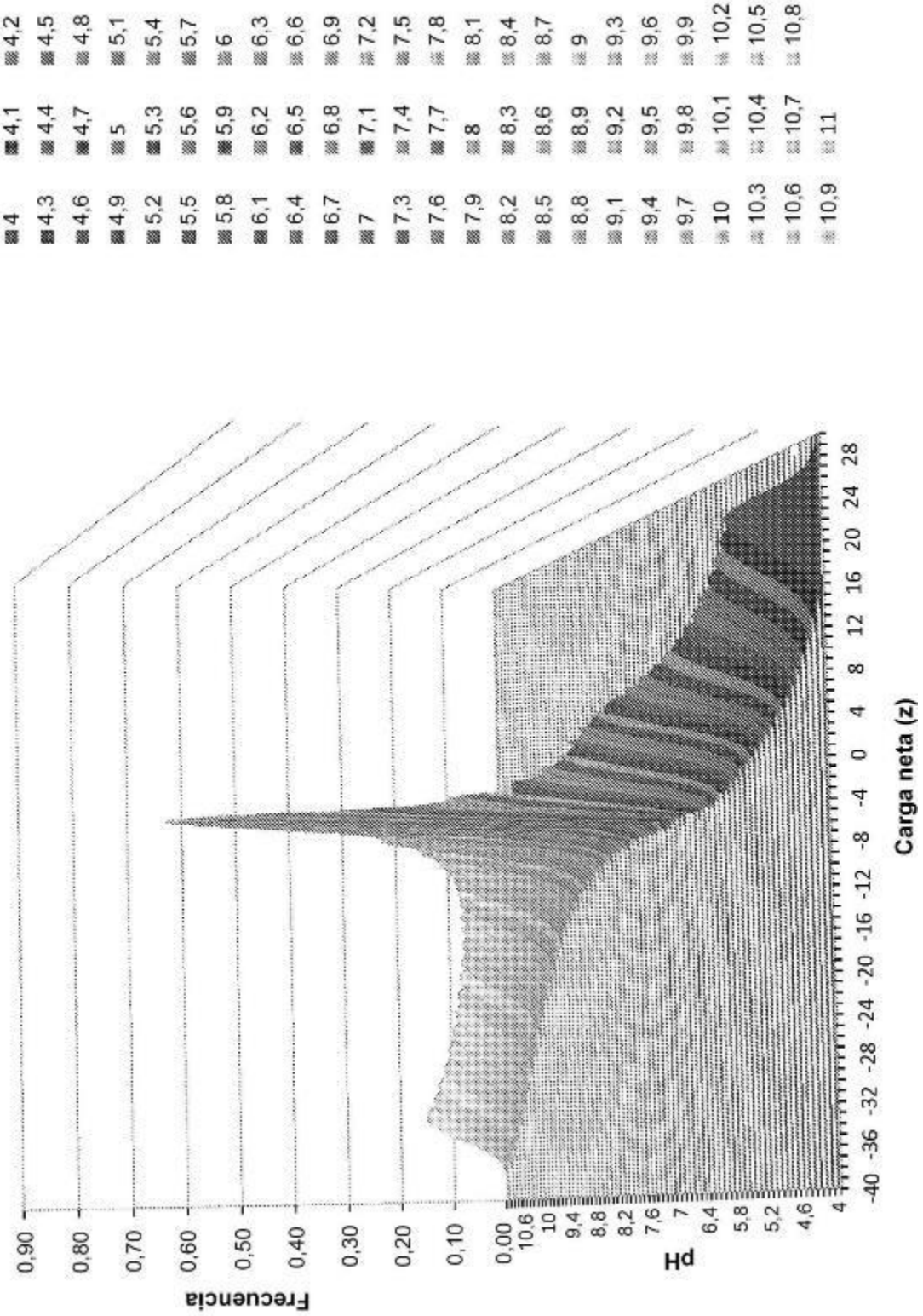

4
4,1
4,2
4,3
4,4
4,5
4,6
4,7
4,8
4,9
5
5,1
5,2
5,3
5,4
5,5
5,6
5,7
5,8
5,9
6
6,1
6,2
6,3
6,4
6,5
6,6
6,7
6,8
6,9
7
7,1
7,2
7,3
7,4
7,5
7,6
7,7
7,8
7,9
8
8,1
8,2
8,3
8,4
8,5
8,6
8,7
8,8
8,9
9
9,1
9,2
9,3
9,4
9,5
9,6
9,7
9,8
9,9
10
10,1
10,2
10,3
10,4
10,5
10,6
10,7
10,8
10,9
11
Frecuencia
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
pH
10,6
10
9,4
8,8
8,2
7,6
7
6,4
5,8
5,2
4,6
4
Carga neta (z)
-40 -36 -32 -28 -24 -20 -16 -12 -8 -4 0 4 8 12 16 20 24 28

Fig. 6

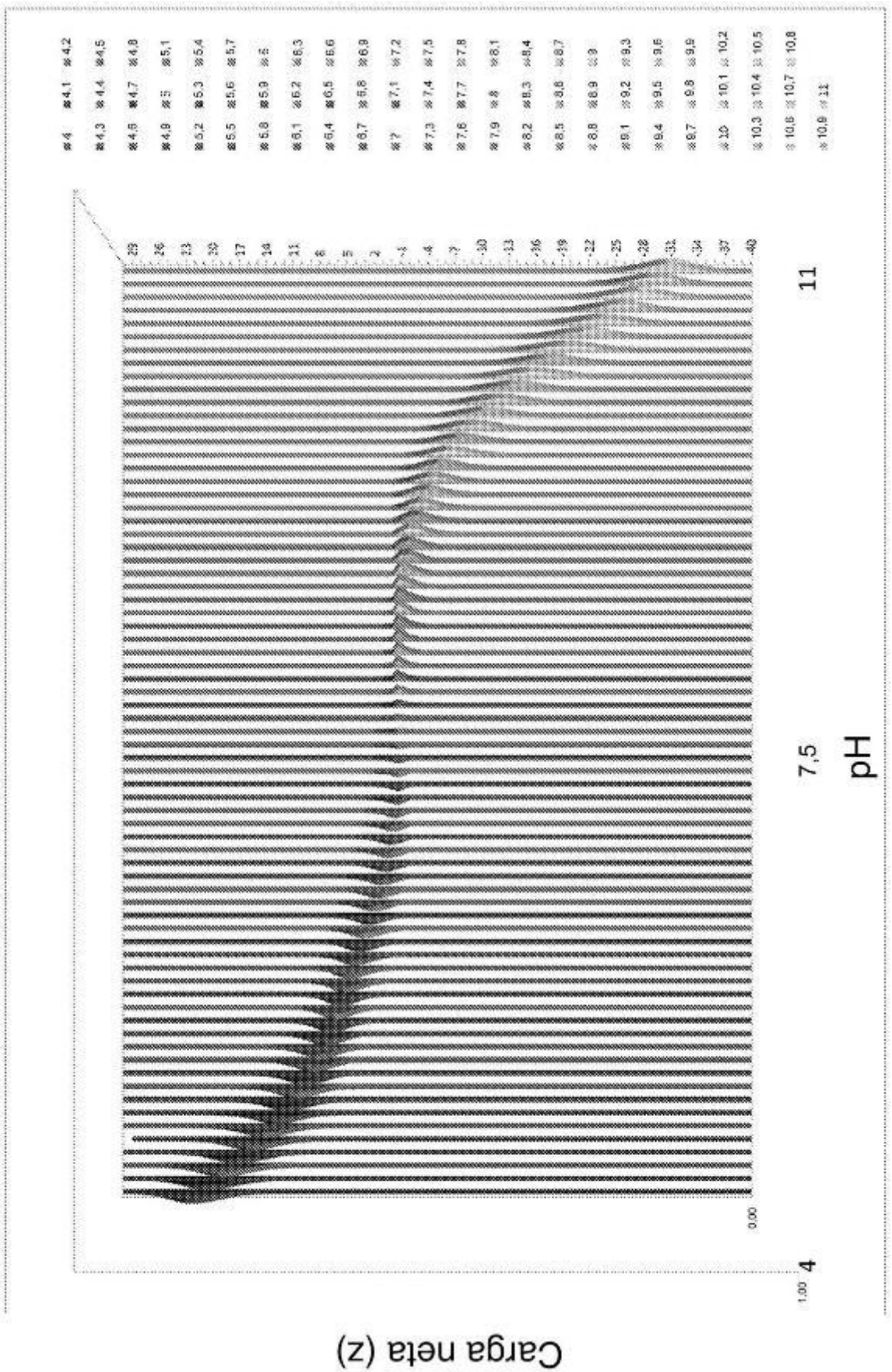
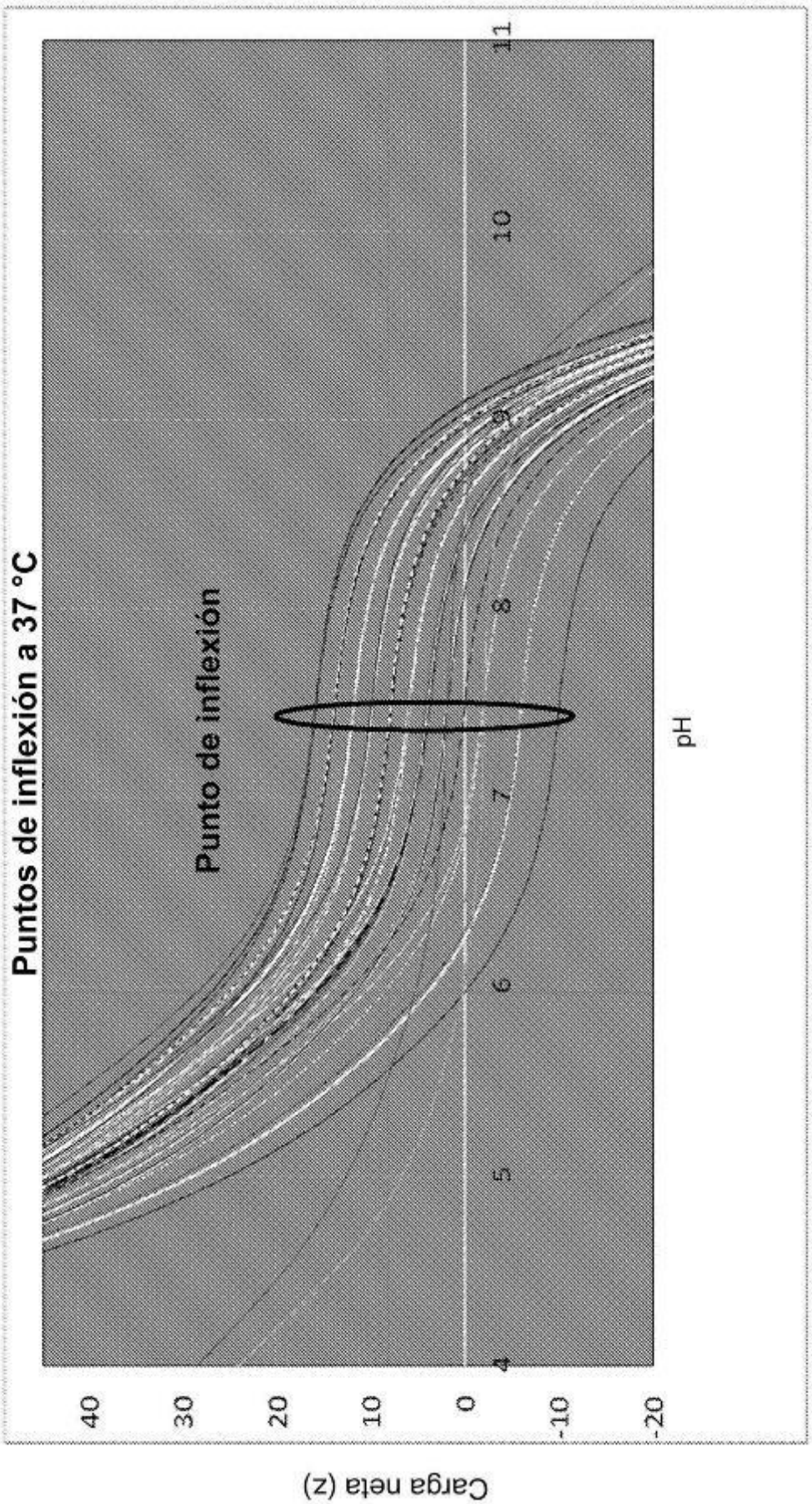


Fig. 7


Puntos de inflexión a 37 °C
Punto de inflexión
Carga neta (z)
40
30
20
10
0
-10
-20
4
5
6
7
8
9
10
11
pH

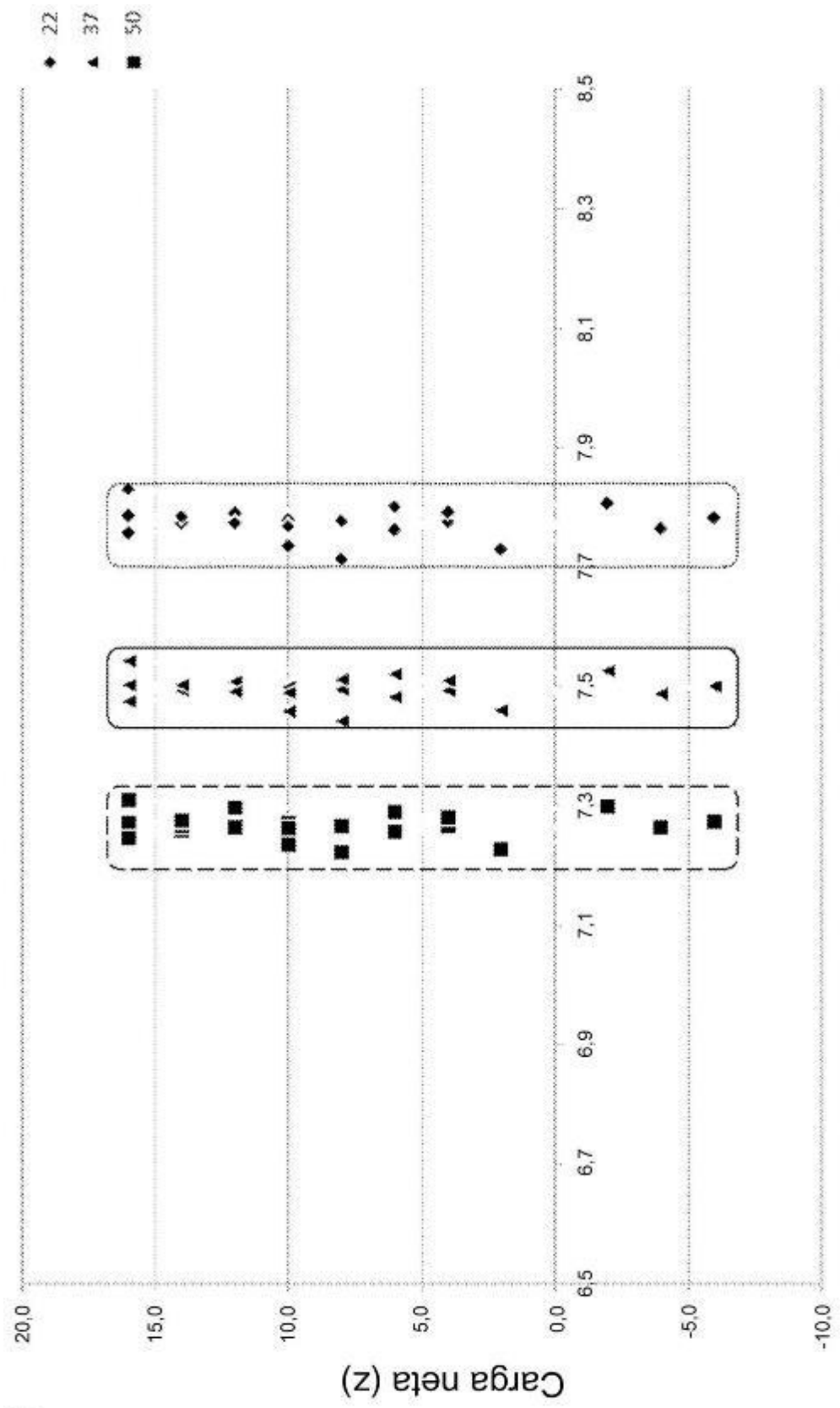

22
37
50
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
-5,0
-10,0
6,5
6,7
6,9
7,1
7,3
7,5
7,7
7,9
8,1
8,3
8,5
Carga neta (z)
Punto de inflexión

Fig. 8

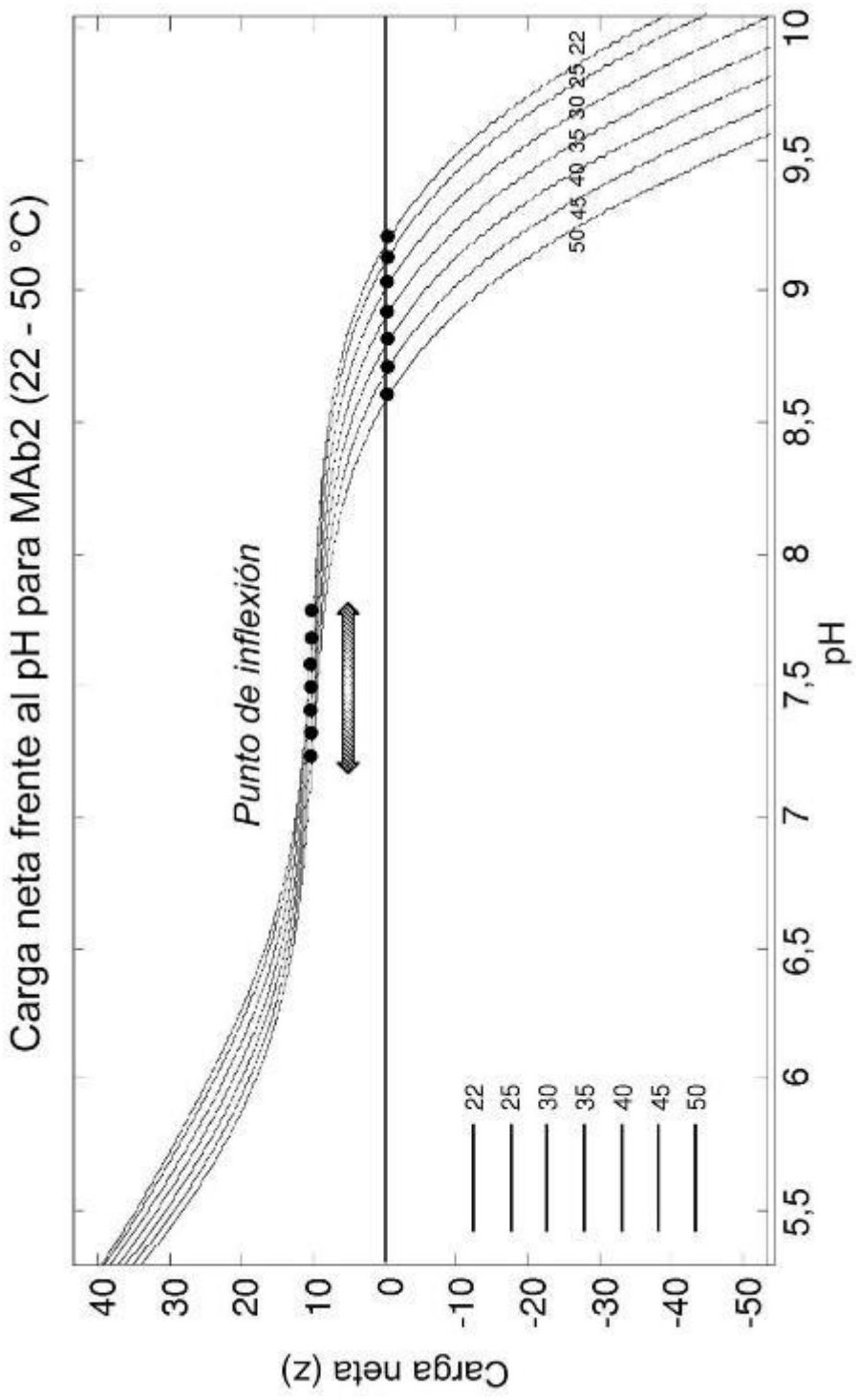

Carga neta frente al pH para MAb2 (22 - 50 °C)
Punto de inflexión
Carga neta (z)
pH
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
5,5
6
6,5
7
7,5
8
8,5
9
9,5
10
22
25
30
35
40
45
50

Fig. 9

Fig. 10A

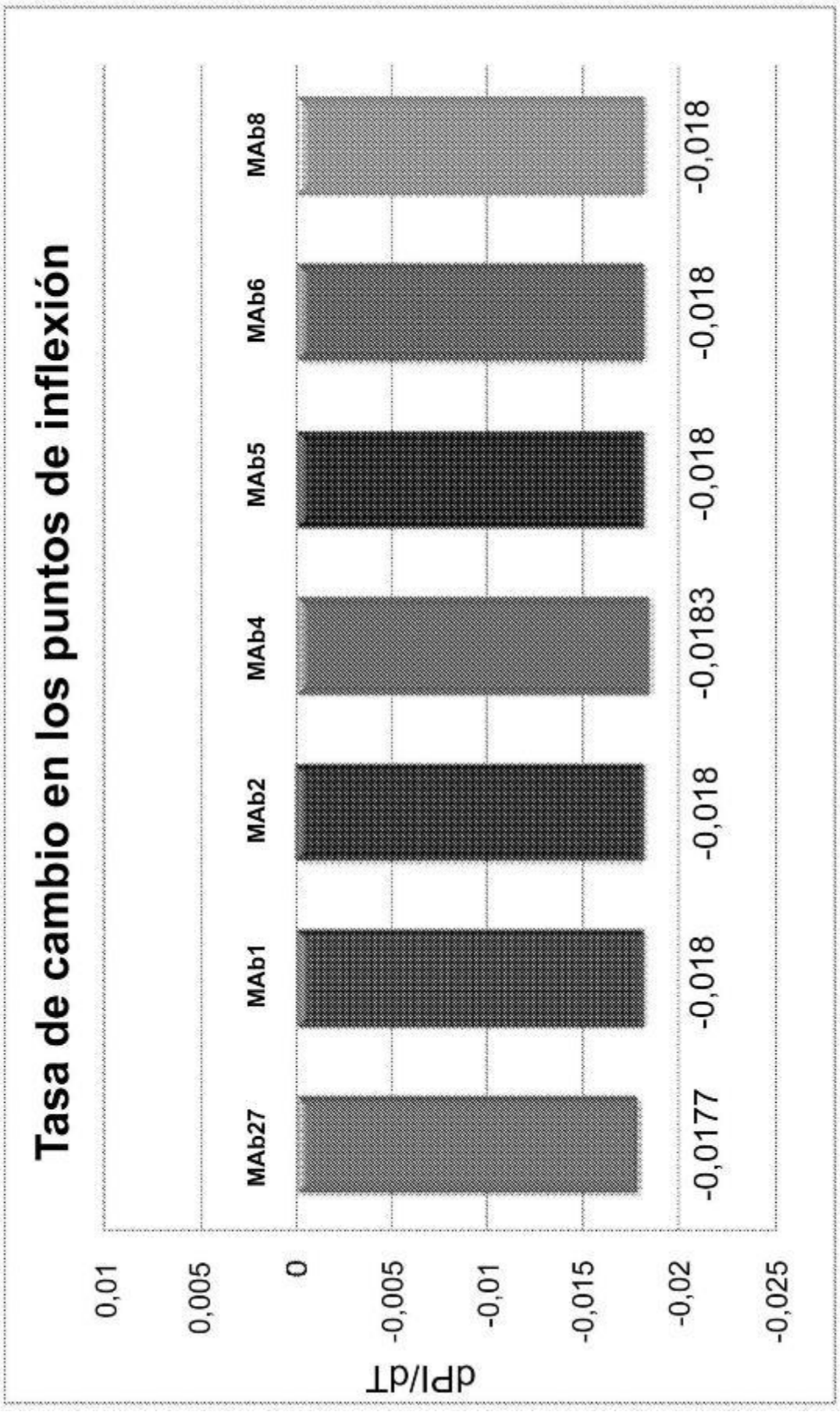

Tasa de cambio en los puntos de inflexión
dPI/dT
0,01
0,005
0
-0,005
-0,01
-0,015
-0,02
-0,025
MAb27
MAb1
MAb2
MAb4
MAb5
MAb6
MAb8
-0,0177
-0,018
-0,018
-0,0183
-0,018
-0,018
-0,018

Fig. 10B

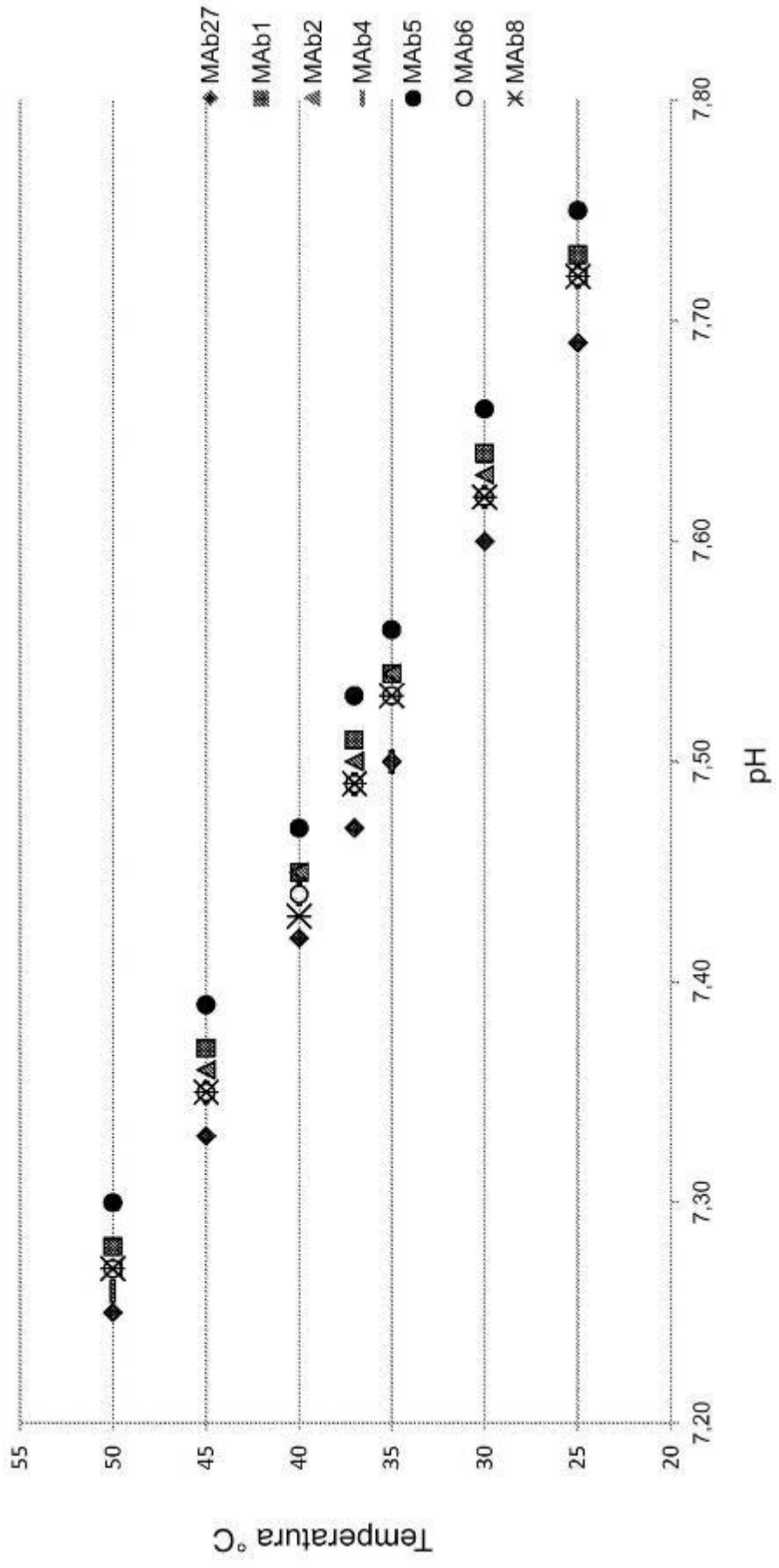

MAb27
MAb1
MAb2
MAb4
MAb5
MAb6
MAb8
Temperatura °C
55
50
45
40
35
30
25
20
7,20
7,30
7,40
7,50
7,60
7,70
7,80
pH

Fig. 11

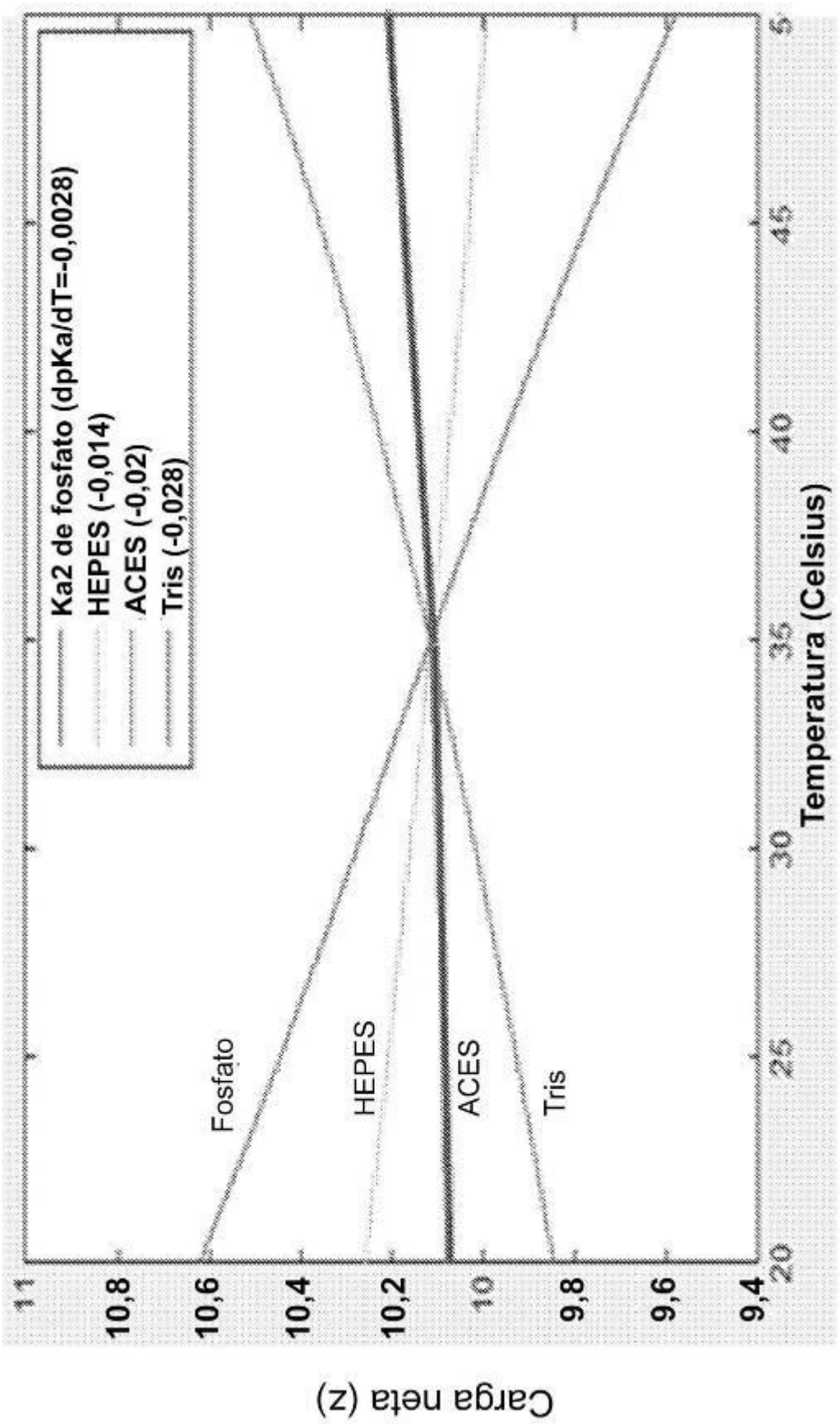

Ka2 de fosfato (dpKa/dT=-0,0028)
HEPES (-0,014)
ACES (-0,02)
Tris (-0,028)
Fosfato
HEPES
ACES
Tris
Carga neta (z)
Temperatura (Celsius)
11
10,8
10,6
10,4
10,2
10
9,8
9,6
9,4
20
25
30
35
40
45
5

Fig. 12

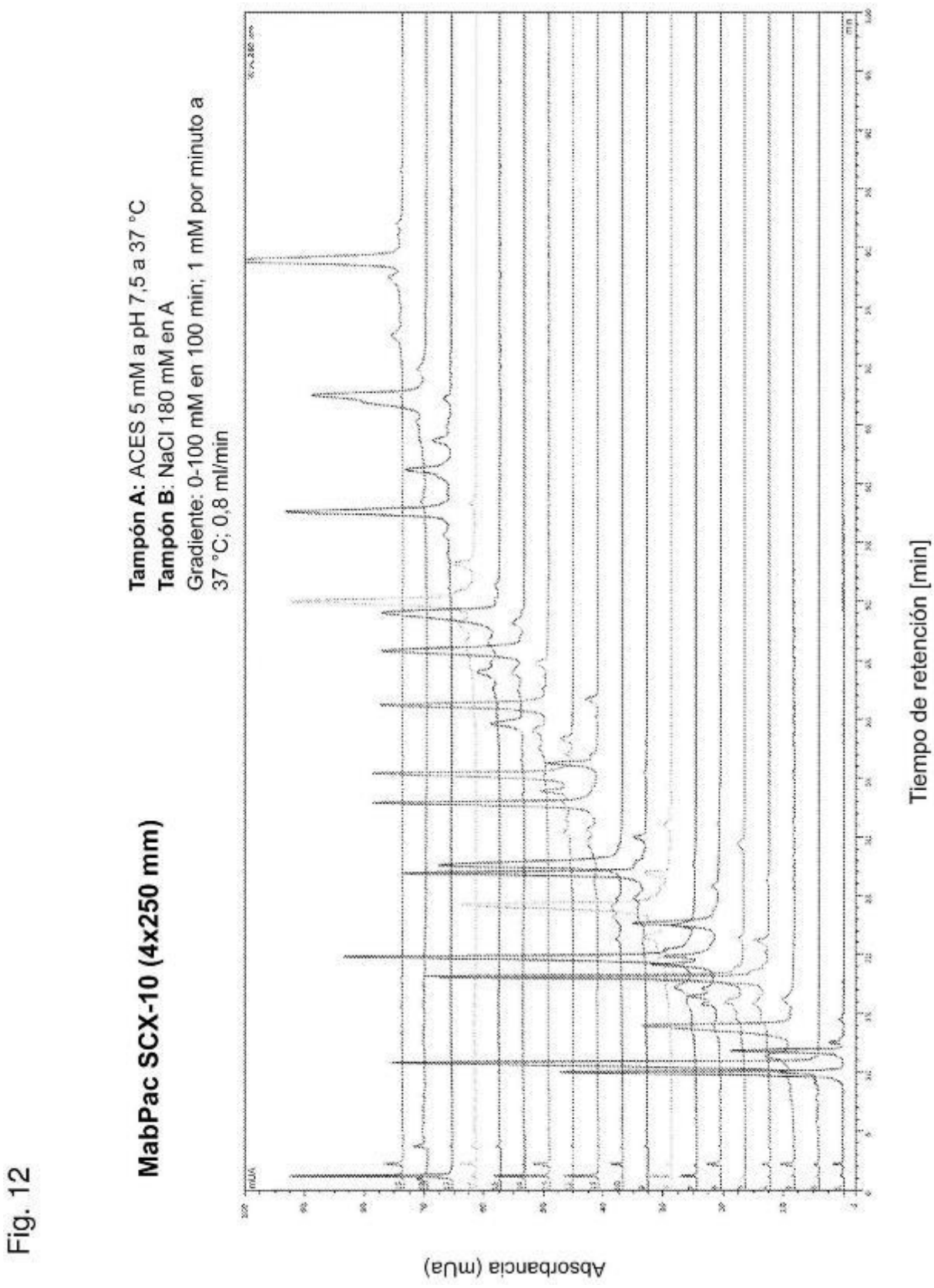

MabPac SCX-10 (4x250 mm)
Tampón A: ACES 5 mM a pH 7,5 a 37 °C
Tampón B: NaCl 180 mM en A
Gradiente: 0-100 mM en 100 min; 1 mM por minuto a
37 °C; 0,8 ml/min
Absorbancia (mUa)
Tiempo de retención [min]

Fig. 13

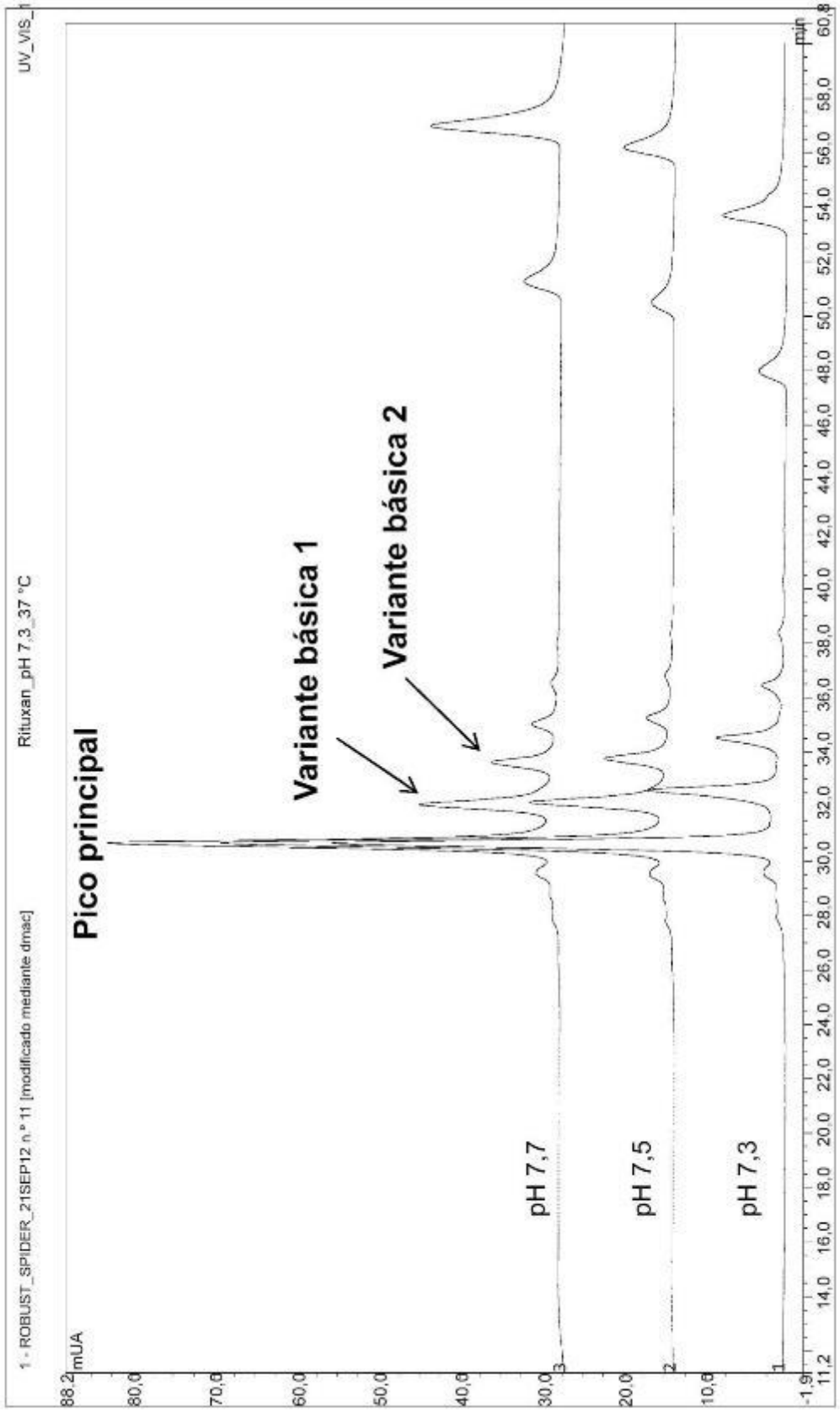

1 - ROBUST_SPIDER_21SEP12 n.º 11 [modificado mediante dmac]
Rituxan_pH 7,3_37 °C
UV_VIS_1
mUA
Pico principal
Variante básica 1
Variante básica 2
pH 7,7
pH 7,5
pH 7,3
Absorbancia (mUa)
Tiempo de retención [min]

Fig. 14

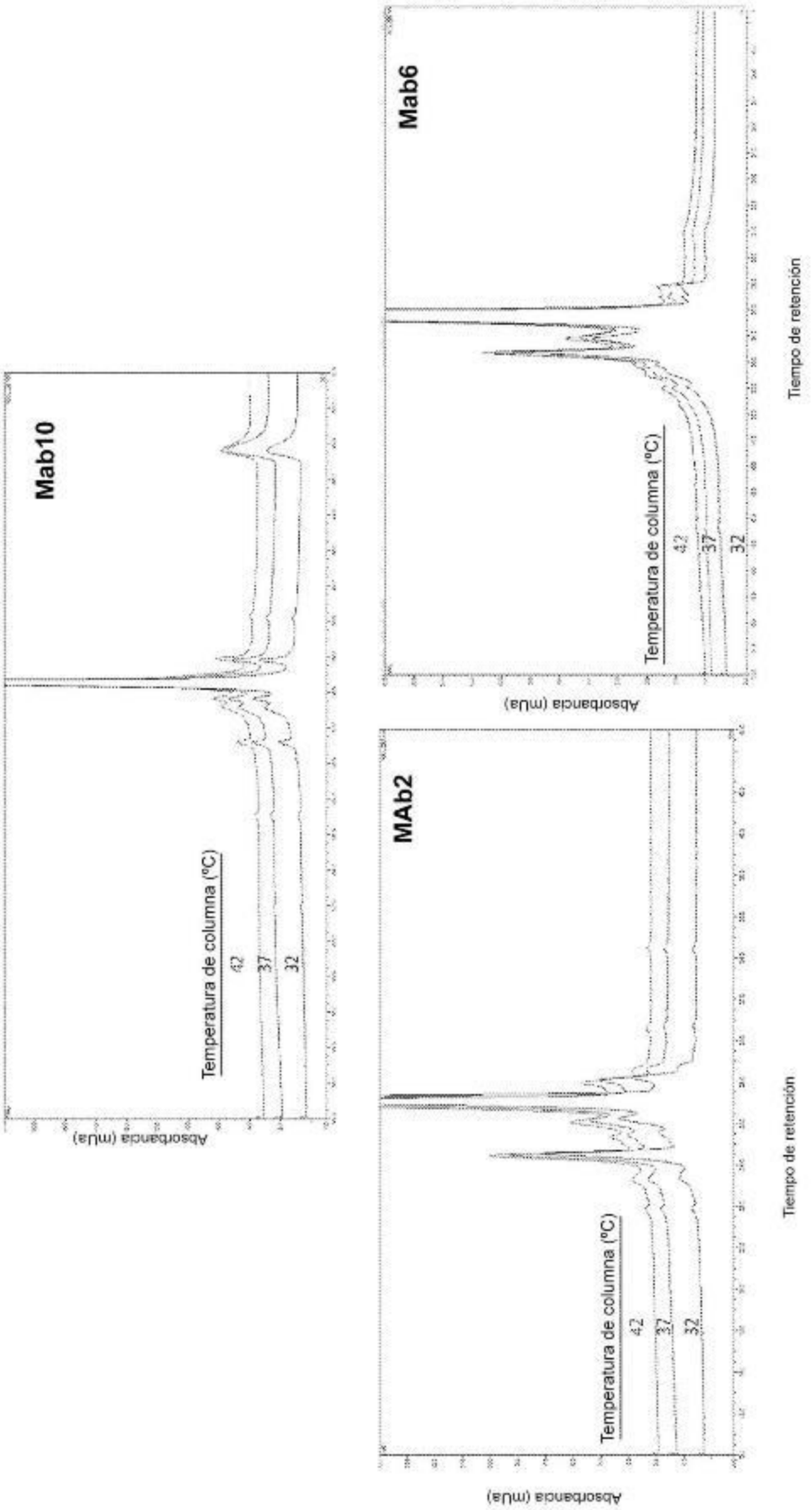

Mab10
Absorbancia (mUa)
Temperatura de columna (ºC)
42
37
32
Mab6
Absorbancia (mUa)
Temperatura de columna (ºC)
42
37
32
Tiempo de retención
MAb2
Absorbancia (mUa)
Temperatura de columna (ºC)
42
37
32
Tiempo de retención

Fig. 15

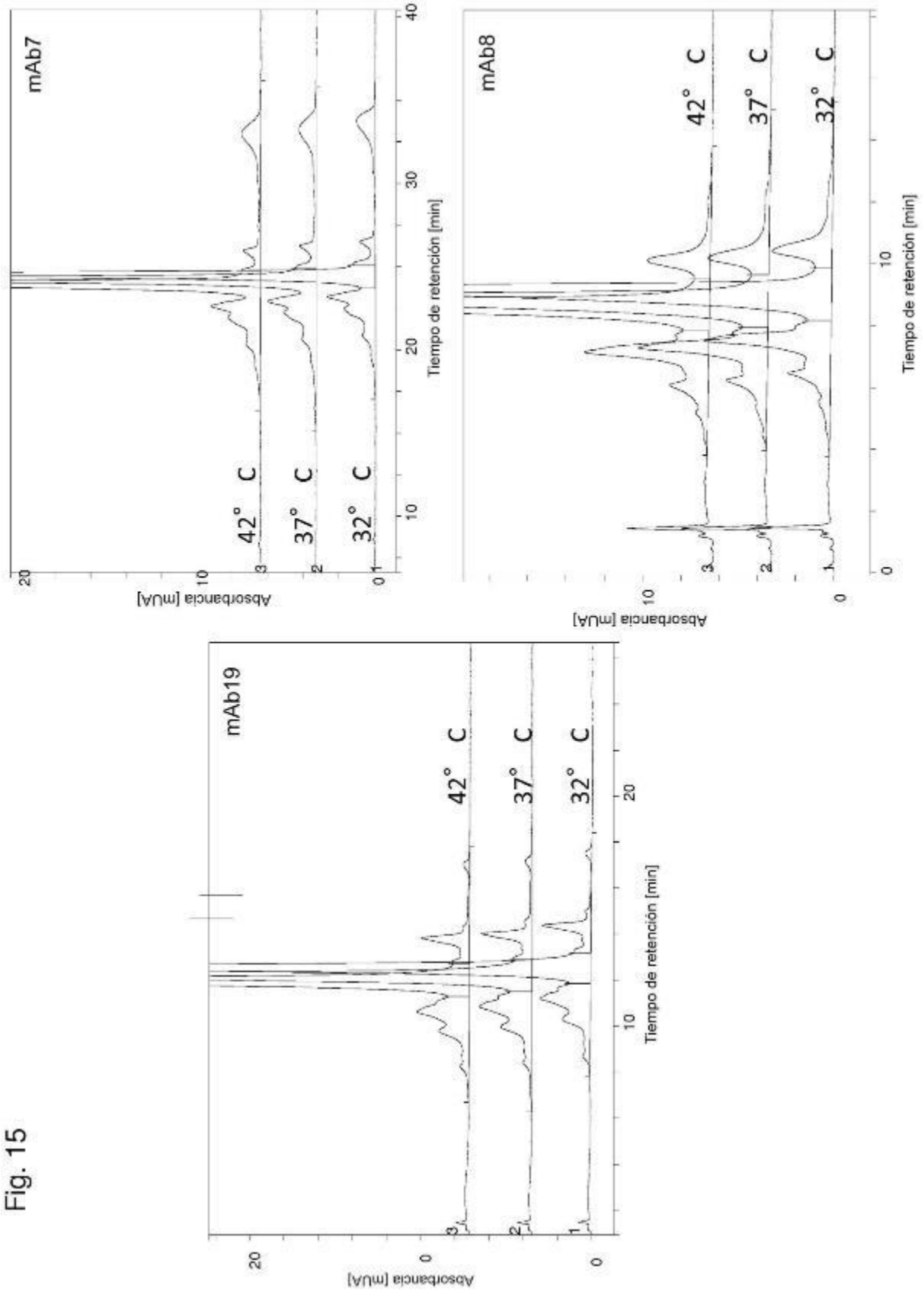

mAb7
42° C
37° C
32° C
Absorbancia [mUA]
Tiempo de retención [min]
mAb8
42° C
37° C
32° C
Absorbancia [mUA]
Tiempo de retención [min]
mAb19
42° C
37° C
32° C
Absorbancia [mUA]
Tiempo de retención [min]

Fig. 16

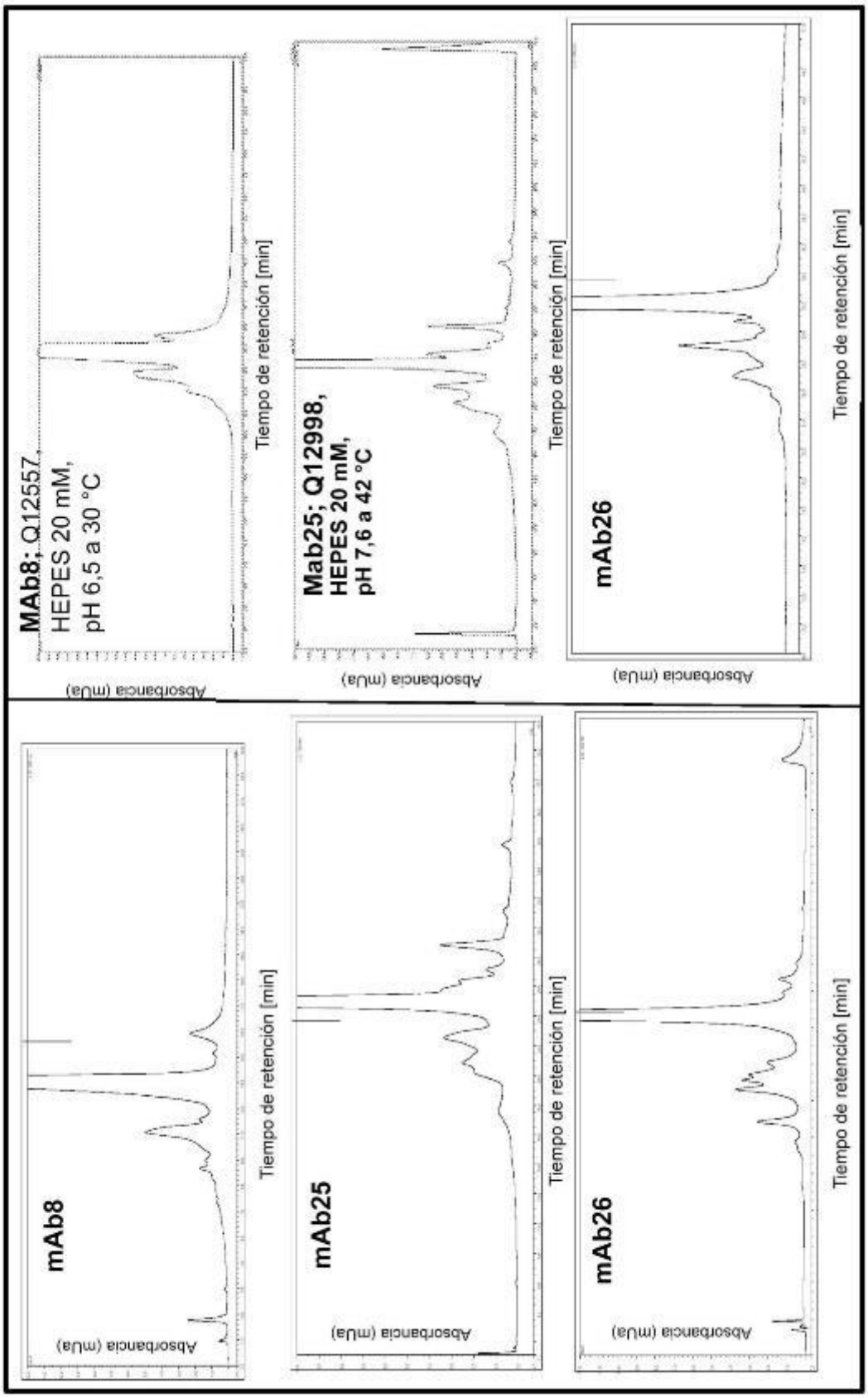

Múltiples productos
Procedimiento específico de producto
mAb8
mAb25
mAb26
MAb8; Q12557,
HEPES 20 mM,
pH 6,5 a 30 °C
Mab25; Q12998,
HEPES 20 mM,
pH 7,6 a 42 °C
mAb26
Absorbancia (mUa)
Tiempo de retención [min]

Fig. 17

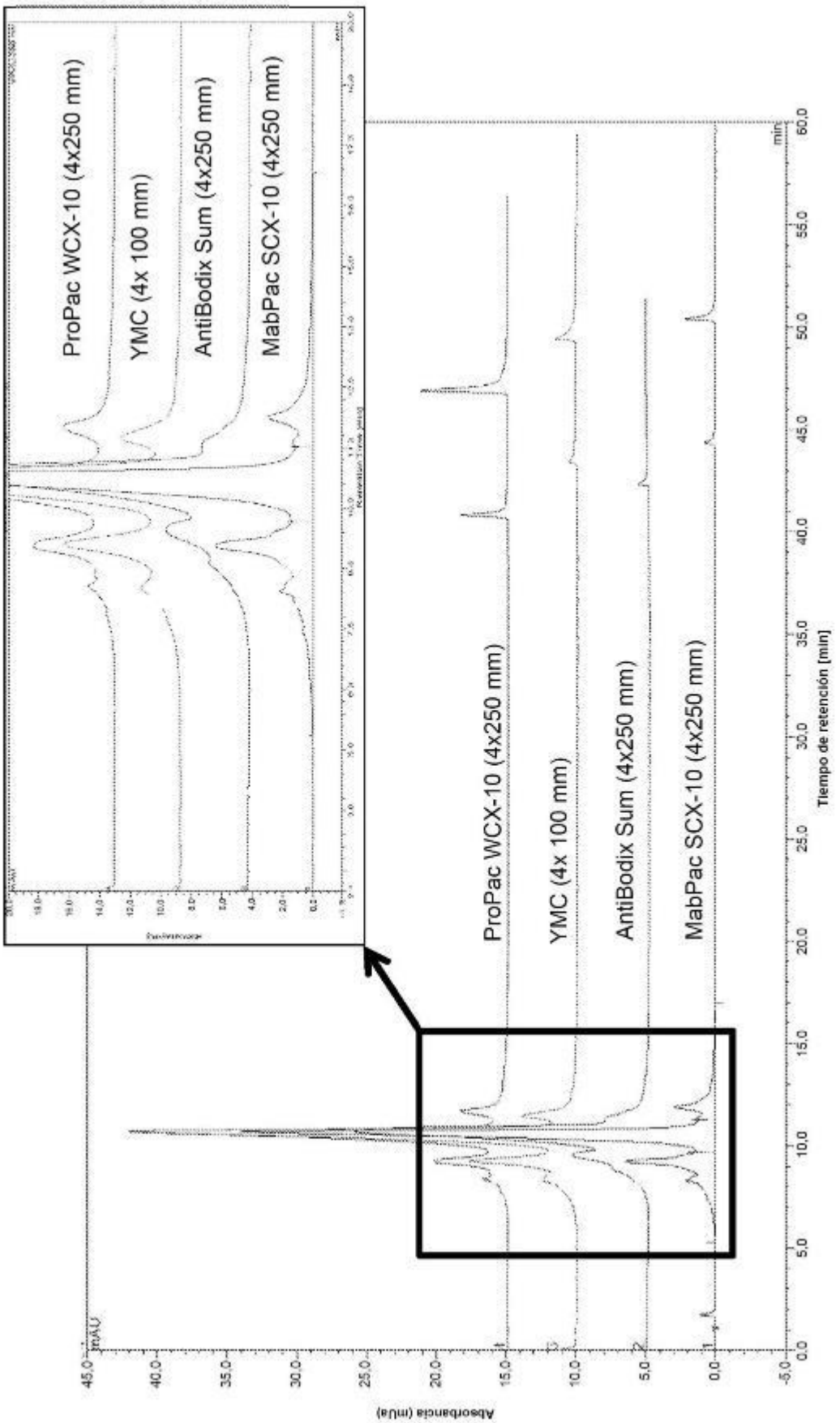

ProPac WCX-10 (4x250 mm)
YMC (4x 100 mm)
AntiBodix Sum (4x250 mm)
MabPac SCX-10 (4x250 mm)
mAU
Absorbancia (mUa)
min
Tiempo de retención [min]

Fig. 18

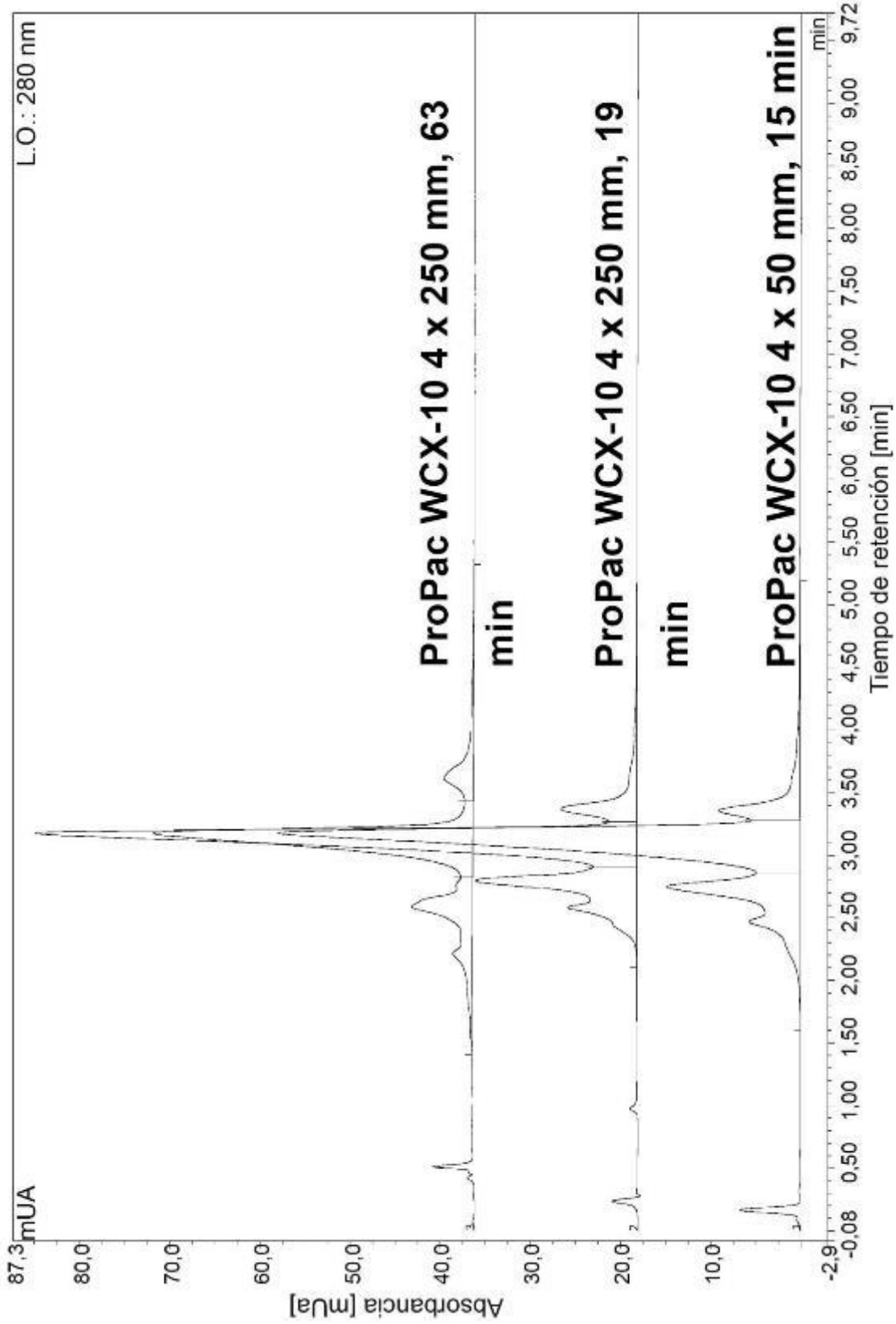

L.O.: 280 nm
mUA
87,3
80,0
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
-2,9
Absorbancia [mUa]
ProPac WCX-10 4 x 250 mm, 63
min
ProPac WCX-10 4 x 250 mm, 19
min
ProPac WCX-10 4 x 50 mm, 15 min
min
-0,08
0,50
1,00
1,50
2,00
2,50
3,00
3,50
4,00
4,50
5,00
5,50
6,00
6,50
7,00
7,50
8,00
8,50
9,00
9,72
Tiempo de retención [min]

Fig. 19

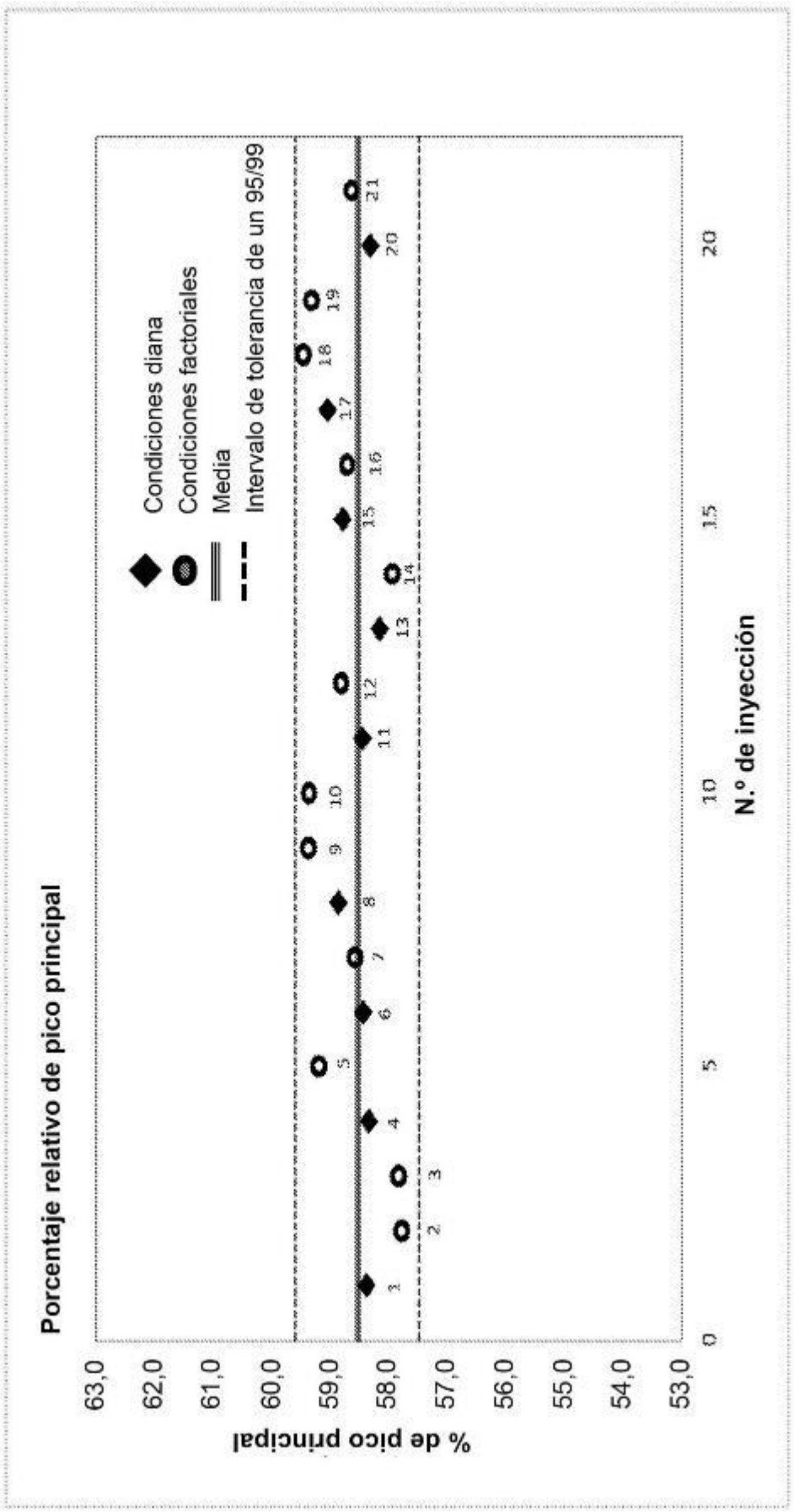

Porcentaje relativo de pico principal
Condiciones diana
Condiciones factoriales
Media
Intervalo de tolerancia de un 95/99
% de pico principal
63,0
62,0
61,0
60,0
59,0
58,0
57,0
56,0
55,0
54,0
53,0
0
5
10
15
20
N.º de inyección

Fig. 20

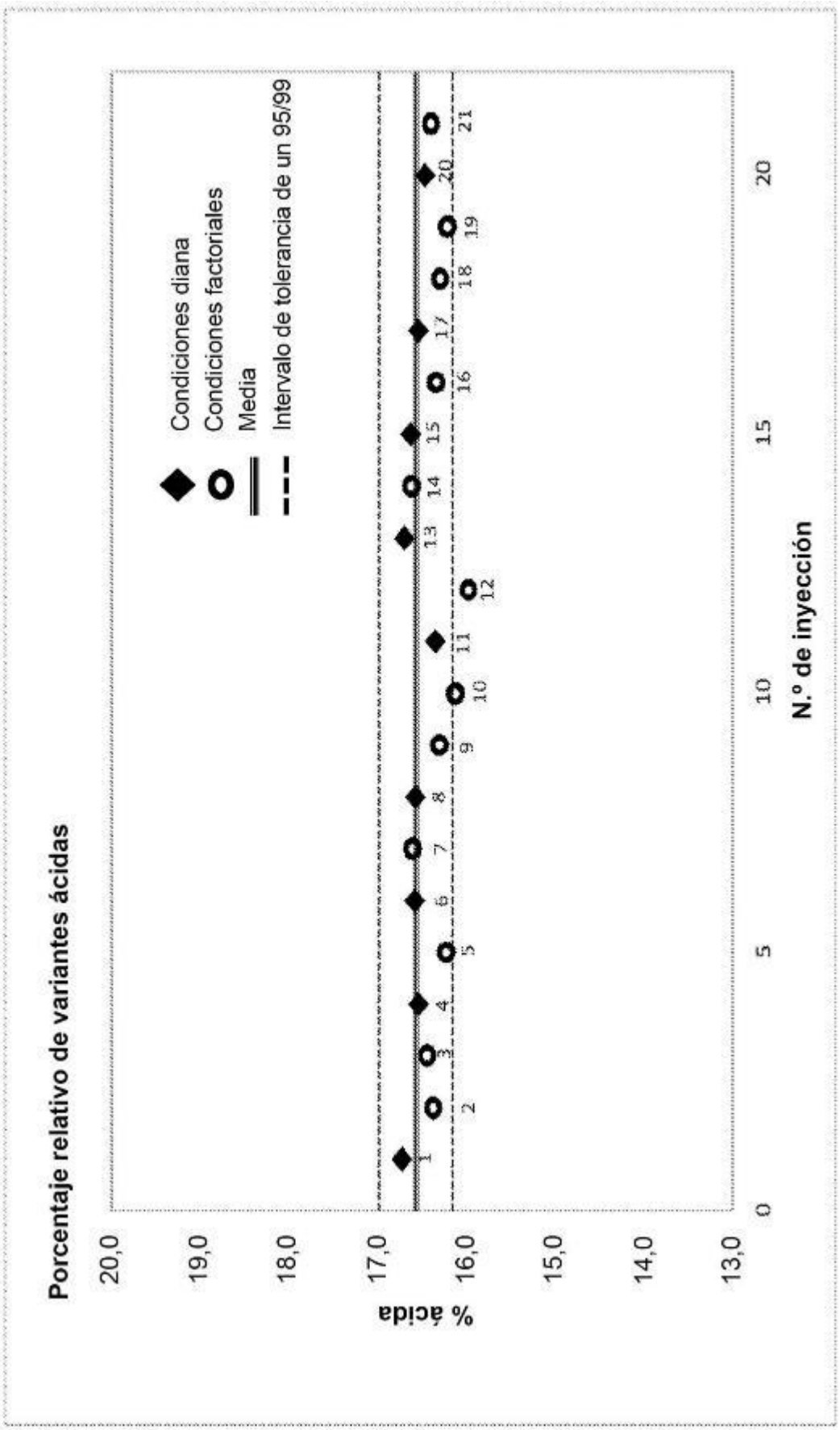
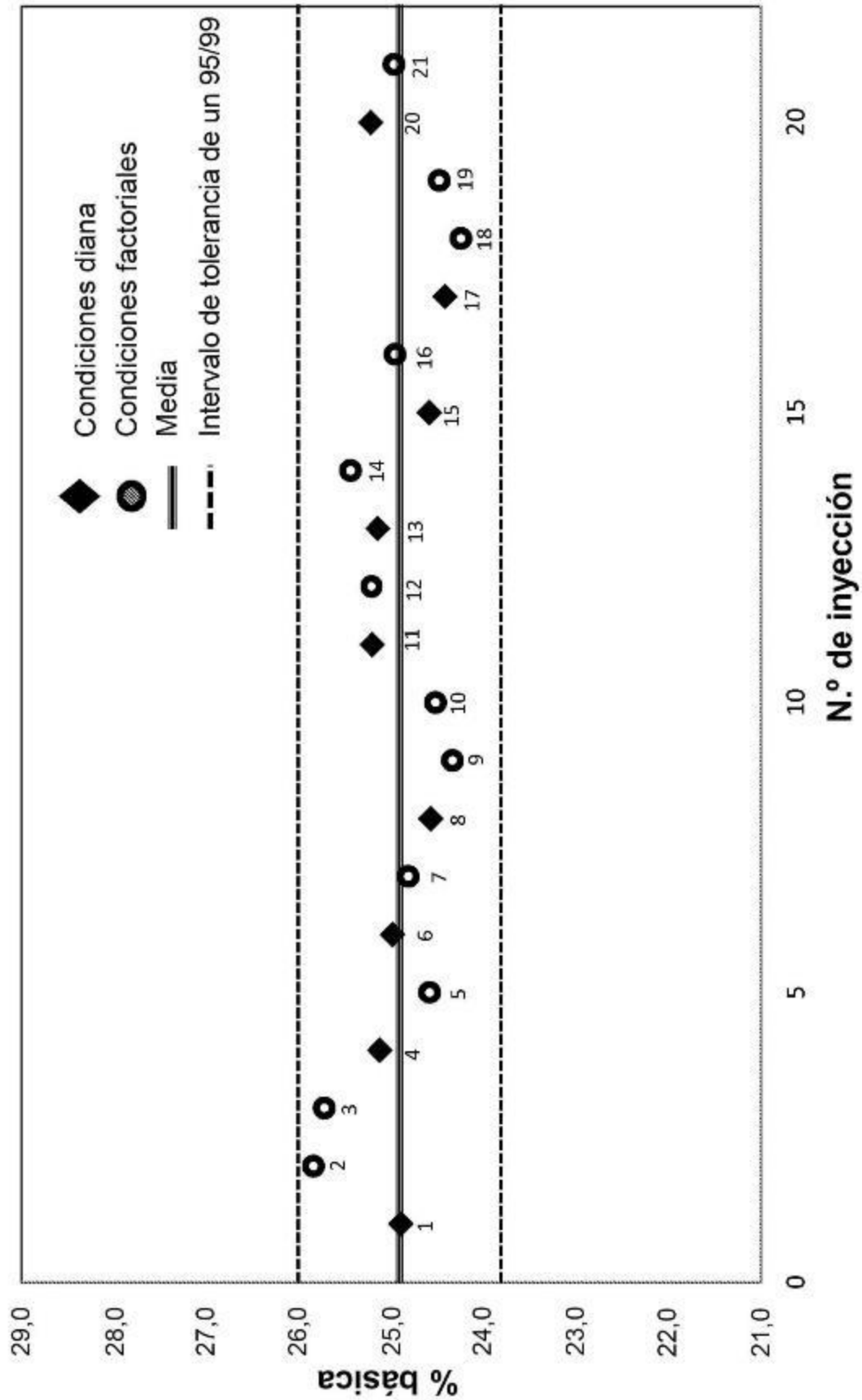

Porcentaje relativo de variantes ácidas
Condiciones diana
Condiciones factoriales
Media
Intervalo de tolerancia de un 95/99
% ácida
20,0
19,0
18,0
17,0
16,0
15,0
14,0
13,0
0
5
10
15
20
N.º de inyección

Fig. 21


Porcentaje relativo de variantes básicas
Condiciones diana
Condiciones factoriales
Media
Intervalo de tolerancia de un 95/99
% básica
N.º de inyección
29,0
28,0
27,0
26,0
25,0
24,0
23,0
22,0
21,0
0
5
10
15
20