

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD

División de Nuevas Cr

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-261580-00000-0000

Fecha 2015-11-03 16:42:03 Dep. 2020 DIR NULVASCOR
Tra. 11 PATENTE IYII Lve. 378 FASE NACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios 53-54

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

UN PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA FORMACION DE ACIDO

54. TITULO _____
PIROGLUTAMICO DE UNA PROTEINA

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____
MABXIENCE S.A.

DOMICILIO _____
MONTEVIDEO, URUGUAY

74. APODERADO _____
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

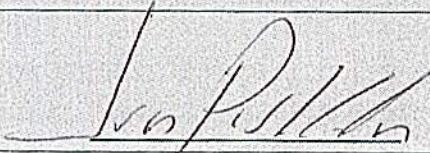
22. BOGOTÁ, D.C. _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 15-261580- -00000-0000 Fecha: 2015-11-03 16:42:03 Dep. 2020 DIR NUEVAS CR Tra 11 PATENTLIYII Lve 378 FASLNACIONALI Act 411 PRESENTACION Folios 55 <i>Scy</i>
--	--

AS. 134.681

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/EP2014/056700	Fecha 03.04.2014
Publicación Internacional No.		WO 2014/161940	Fecha 09.10.2014
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
UN PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA FORMACIÓN DE ÁCIDO PIROGLUTÁMICO DE UNA PROTEÍNA			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
1. MABXIENCE S.A.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		Torre de los Profesionales, Yaguarón 1407 Oficina	No. TELÉFONO
CIUDAD		904, 11100	
DEPARTAMENTO/ESTADO		Montevideo	CORREO ELECTRÓNICO
PAÍS DE RESIDENCIA		UY	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. VAN SCHRAVENDIJK		Marie Rose	US
2. WAUGH		Stephen	US
3. THORNE		Barbara	US
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. US	MA	Worcester	37 Sun Valley Dr., 01609
2. US	WA	Bothell	22021 20 th Avenue S.E., 98021
3. US	WA	Sammamish	3626 223 rd Avenue SE, 98075
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CADENA SARMIENTO		JUAN PABLO	C.C . 80.410.337 T.P . 57492
DIRECCIÓN		Calle 70A 4 41	No. TELÉFONO 7442200
CIUDAD		Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO notificaciones@bc.com.co
PAÍS		CO	No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1. EP		EP	13162241.7
2.			(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2013/04/04

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 15-101486, 15-101555	Fecha: 03.11.2015
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 4-33		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 15		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 43-49		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☒ Otros, especificar: PCT/IB/306	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2014/161940 A1

(43) International Publication Date
9 October 2014 (09.10.2014)

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2014/056700

(22) International Filing Date:
3 April 2014 (03.04.2014)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
13162241.7 4 April 2013 (04.04.2013) EP

(71) Applicant: MABXIENCE S.A. [UY/UY]; Torre de los
Profesionales, Yaguarón 1407 Oficina 904, Montevideo,
11100 (UY).

(71) Applicant (for AG only): MABXIENCE SWITZER-
LAND [CH/CH]; Via Maggio 1, CH-6900 Lugano (CH).

(72) Inventors: VAN SCHRAVENDIJK, Marie Rose; 37 Sun
Valley Dr., Worcester, Massachusetts 01609 (US).
WAUGH, Stephen; 22021 20th Avenue S.E., Bothell,
Washington 98021 (US). THORNE, Barbara; 3626 -
223rd Ave SE, Sammamish, Washington 98075 (US).

(74) Agent: ZBM PATENTS- ZEA, BARLOCCI & MARK-
VARDSEN; Pl. Catalunya, 1, E-08002 Barcelona (ES).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(ii))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))
— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



WO 2014/161940 A1

(54) Title: A METHOD FOR INCREASING PYRO-GLUTAMIC ACID FORMATION OF A PROTEIN

(57) Abstract: A method for conversion of an N-terminal glutamine and/or glutamic acid residue of a protein to pyro-glutamic acid within a purification process.

UN PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA FORMACIÓN DE ÁCIDO PIROGLUTÁMICO DE UNA PROTEÍNA

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un procedimiento para la conversión de un residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de una proteína en ácido piroglutámico en un proceso de purificación. Además, la presente invención también se refiere a un procedimiento de purificación de una proteína que contiene un ácido piroglutámico N-terminal. Los procedimientos de la presente invención se pueden incluir en un proceso de fabricación para preparar una proteína que tiene un ácido piroglutámico N-terminal, en particular, para preparar un principio farmacéutico activo (API) para un producto farmacéutico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La mayoría de las proteínas terapéuticas recombinantes presentan una o varias modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones pueden producirse durante su síntesis ribosómica o (más habitualmente) después de finalizada la síntesis. Hasta la fecha se han caracterizado un gran número de modificaciones postraduccionales y estas modificaciones pueden impartir algún aspecto estructural o un papel funcional a la proteína afectada. Las modificaciones postraduccionales asociadas con proteínas terapéuticas incluyen la carboxilación, hidroxilación, amidación y sulfatación, formación de puentes disulfuro y procesamiento proteolítico, así como glucosilación, isomerización, oxidación, ciclación de una glutamina o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico, fragmentación y agregación. Por lo tanto, las modificaciones postraduccionales pueden estar causadas por modificación enzimática de la proteína o por conversión no enzimática y pueden producirse modificaciones postraduccionales dentro del hospedador de expresión, durante el cultivo celular o durante la purificación o conservación de la proteína.

Los anticuerpos monoclonales recombinantes se están convirtiendo en una herramienta de gran valor para la industria de la biotecnología y se han aprobado numerosos anticuerpos para el tratamiento de diversas enfermedades. Como los anticuerpos generalmente se producen en células de mamífero, tales como las células CHO, estos pueden tener diferentes modificaciones postraduccionales que conducen a la heterogeneidad en el producto. La heterogeneidad puede estar causada por cambios en la carga superficial del anticuerpo, bien directamente,

como un cambio en el número de residuos cargados, o indirectamente, como una alteración química o física que cambia la distribución de la carga superficial tal como glucosilación, corte por carboxipeptidasa de la lisina C-terminal de la cadena pesada y ciclación de un residuo de glutamina o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico.

Los anticuerpos están constituidos generalmente por unidades estructurales básicas, cada una de las ellas con dos cadenas pesadas grandes y dos cadenas ligeras pequeñas unidas a través de puentes disulfuro e interacciones no covalentes. Existen diferentes tipos de cadenas pesadas de anticuerpo y diferentes tipos de anticuerpos, las cuales se agrupan en diferentes isotipos en función del tipo de cadena pesada que posean. Por ejemplo, existen cuatro isotipos de la IgG humana (1 a 4), dependiendo del gen que codifica para la región constante de la cadena pesada. El dominio constante de la cadena ligera está codificado por dos genes (κ o λ). Por consiguiente, cada isotipo de IgG puede ser κ o λ , por ejemplo, IgG1 κ . Aunque existen varios tipos de anticuerpos producidos en diferentes tipos de líneas celulares, los anticuerpos clínicamente más significativos son anticuerpos de longitud completa de los tipos IgG1 o IgG2.

Muchos de los anticuerpos humanos de tipo IgG1 o IgG2 contienen un residuo de ácido glutámico (Glu) y/o de glutamina (Gln) en el extremo N-terminal de la cadena ligera o de la cadena pesada o en ambas. Una parte importante de los genes de cadena ligera codifican para ácido glutámico o glutamina. Dichos residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal pueden sufrir ciclación para formar piroglutamato (pGlu), tal y como se muestra en la Figura 1. La formación de piroglutamato se produce, por lo tanto, en prácticamente todos los anticuerpos clínicamente significativos y los diferentes niveles de finalización del procedimiento son una fuente común de heterogeneidad. Esta heterogeneidad no es deseada en anticuerpos terapéuticos, ya que estos cambios pueden alterar las propiedades de carga superficial del anticuerpo o bien directamente cambiando el número de grupos cargados o indirectamente introduciendo alteraciones estructurales. Dichas modificaciones tienen el potencial de reducir la actividad biológica, así como alterar la farmacocinética y la antigenicidad.

Durante la ciclación de la glutamina, la amina primaria N-terminal (cargada positivamente a pH neutro) se convierte en una amida neutra, lo que resulta en un cambio de la carga neta del anticuerpo. La reacción va acompañada de una pérdida de amoníaco (17 Da). Por consiguiente, la ausencia de ciclación puede ser detectada como variantes básicas por cromatografía de intercambio catiónico,

ya que el pico principal es generalmente la especie totalmente ciclada o como picos de elución tardía por HPLC de fase inversa debido a la mayor hidrofobicidad después de la pérdida de la amina N-terminal.

La ciclación del ácido glutámico se produce a través del grupo carboxilo de la cadena lateral y de la amina N-terminal, formando así una amida neutra y liberando agua (18 Da). La carga neta sigue siendo la misma debido a que se condensan en la reacción un grupo ácido y uno básico, sin embargo, la pérdida de dos residuos cargados aumenta la hidrofobicidad de la molécula, lo que permite la detección por HPLC de fase inversa.

No se conoce completamente el mecanismo de formación de ácido piroglutámico en anticuerpos. La ciclación puede suceder espontáneamente o puede ser facilitada por una enzima glutaminil ciclasa. Sigue sin quedar claro si la glutaminil ciclasa es activa en la línea celular CHO, que es la utilizada más frecuentemente en la producción de anticuerpos; sin embargo, tasas de ciclación espontánea indican que la reacción probablemente no sea enzimática.

Por ejemplo, Yu et al. (Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2006; 42:455–463) investigaron la formación no enzimática de piroglutamato a partir de ácido glutámico (Glu o E) en el extremo N-terminal tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal durante un período de 3 meses. Yu et al. afirman que esta ciclación no enzimática de Glu en pGlu de los Acm podría ser una de las principales vías de degradación que intervienen en la producción y almacenamiento de Acm dependiendo de las condiciones de pH y temperatura durante el proceso de desarrollo. Estos autores concluyeron que no está claro que dicho piroGlu pueda inducir otras modificaciones y alterar la bioactividad o la potencia terapéutica del Acm, proponían controlar minuciosamente la formación de pGlu N-terminal, ya que podría ser crítico para garantizar la calidad del efecto terapéutico de los Acm con Glu N-terminal.

Chelius et al. (Anal. Chem. 2006, 78, 2370-2376) también han investigado la formación no enzimática de piroglutamato a partir de ácido glutámico en el extremo N-terminal tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada de varios anticuerpos monoclonales y han descubierto que esta reacción no enzimática se produce muy frecuentemente y que puede detectarse tras unas semanas de incubación a 37 °C y 45 °C. La velocidad de esta reacción se midió en varios tampones acuosos con diferentes valores de pH, observándose una formación mínima de ácido piroglutámico a pH 6,2 y un aumento de la formación de ácido piroglutámico a pH 4 y pH 8.

Vista la conversión de glutamina (Gln o Q) en piroglutamato, Dick et al. (Biotechnology and Bioengineering, Vol. 97, N° 3, 15 de junio de 2007) demostraron que dicha ciclación de la glutamina N-terminal de un anticuerpo monoclonal recombinante se produce espontáneamente y concluían que la conversión casi completa observada en muchos anticuerpos monoclonales en el acondicionamiento final lo más probable es que esté causada por una combinación de las condiciones de incubación y purificación en el biorreactor, teniendo lugar gran parte de la modificación en el biorreactor. Este estudio demuestra que la variante piro-Q frecuentemente observada en muchos anticuerpos recombinantes se produce dentro del biorreactor, existiendo una pequeña contribución del procedimiento de purificación y está acelerada por la temperatura elevada y la composición del disolvente. Específicamente, la mayor conversión se observa a 37 °C y en un tampón fosfato a 35 mM con NaCl 75 mM (pH 6,2).

Así, las modificaciones postraduccionales, tales como la ciclación del residuo de glutamina o ácido glutámico N-terminal pueden conducir a heterogeneidad de la proteína expresada que puede diferir de un lote a otro debido a ligeras variaciones en las condiciones de producción y purificación. Por consiguiente, uno de los retos más difíciles para producir una proteína biosimilar es comprobar la heterogeneidad del producto innovador. Por lo tanto, se necesita un procedimiento de purificación robusto y reproducible a escala industrial con un soporte analítico para satisfacer los estrictos requisitos de pureza en proteínas farmacéuticas, tales como anticuerpos.

RESUMEN DE LA INVENCION

Un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de conversión de un residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de una proteína en ácido piroglutámico en un proceso de purificación, que comprende la etapa de incubar la proteína en condiciones que promueven la ciclación del residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de purificación de una proteína que contiene un residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal, comprendiendo el procedimiento una etapa de conversión del residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de dicha proteína en ácido piroglutámico N-terminal. Dicha conversión se realiza en condiciones que promueven la ciclación del residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de

preparación de una proteína que tiene un ácido piroglutámico N-terminal tal como un principio activo para el producto farmacéutico, el procedimiento comprendiendo cualquiera de los procedimientos de purificación del primer o segundo aspecto, así como realizaciones de los mismos.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un proceso alternativo de preparación de una proteína que tiene niveles mayores o controlados de ácido piroglutámico N-terminal con el fin de reducir u obtener la heterogeneidad deseada del producto.

Los presentes inventores han descubierto que introduciendo una etapa de incubación/conversión de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico durante el proceso de purificación de una proteína que tiene un residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal, en particular de un anticuerpo monoclonal, el nivel de heterogeneidad se puede manipular hasta los niveles deseados.

Otros objetos de la presente invención se harán evidentes tras la lectura de la presente descripción, Figuras y reivindicaciones.

DEFINICIONES:

El término "identidad" tal y como se usa en el presente documento se refiere al grado de relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos y se describe por el parámetro "identidad de secuencia". Para los propósitos de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) según implementado en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización de hueco abierto de 10, penalización de extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle marcado como "identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente forma: $(\text{Residuos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de alineamiento} - \text{Número total de huecos en el alineamiento})$.

El término "N-terminal" "extremo N-terminal" o "amino terminal" tal y como se usa en el presente documento se refiere a un grupo amina libre ($-\text{NH}_2$) en la parte terminal de una proteína o polipéptido. La forma habitual de escribir una secuencia de proteína o polipéptido es poner el extremo N-terminal en la izquierda y escribir

la secuencia desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal. Cuando la proteína o polipéptido se traduce del ARN mensajero, esta se crea desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal.

El término "glutamina", "ácido 2-amino-4-carbamoilbutanoico", "Gln" o "Q" tal y como se usa en el presente documento es uno de los 20 aminoácidos codificados por el código genético común. Su cadena lateral es una amida formada por sustitución de la cadena lateral carboxilo del ácido glutámico con un grupo funcional amida. Por consiguiente, se puede considerar la amida del ácido glutámico.

El término "ácido glutámico", "ácido 2-aminopentanodioico", "Glu" o "E" tal y como se usa en el presente documento es uno de los 20 aminoácidos codificados por el código genético común. El grupo funcional del ácido carboxílico de la cadena lateral existe en su forma carboxilada desprotonada con carga negativa a pH fisiológico.

El término "polipéptido" tal y como se usa en el presente documento se refiere a una única cadena lineal de monómeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Los aminoácidos que han sido incorporados en un polipéptido se denominan "residuos"; cada polipéptido tiene un residuo N-terminal y uno C-terminal en los respectivos extremos del polipéptido. Los polipéptidos tal y como se usan en el presente documento son péptidos más largos que comprenden más de aproximadamente 20 aminoácidos consecutivos.

El término "proteína" tal y como se usa en el presente documento se refiere a compuestos bioquímicos que consisten en uno o más polipéptidos generalmente plegados en una forma globular o fibrosa, facilitando una función biológica. Una proteína puede estar unida por enlaces diferentes a los enlaces peptídicos, por ejemplo, dichos polipéptidos que constituyen la proteína pueden estar unidos por enlaces disulfuro. El término "proteína" tal y como se usa en el presente documento se pretende que abarque anticuerpos, fragmentos de proteínas y anticuerpos, formas escindidas de proteínas y anticuerpos y similares, que tienen más de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos consecutivos. Además, proteína tal y como se usa en el presente documento se pretende que abarque polipéptidos que se encuentran de manera natural y polipéptidos producidos de manera recombinante.

El término "ácido piroglutámico", "5-oxoprolina", "ácido pídólico" o "piroglutamato" tal y como se usa en el presente documento se refiere en términos generales a un derivado de aminoácido poco común en el que el grupo amino libre del ácido

glutámico o la glutamina se cicla para formar una lactama. Se ha encontrado en muchas proteínas (por ej., bacteriorodopsina, fibrina, fibrinógeno), péptidos neuronales y hormonas (por ej., Neurotensina, Gastrina, Apelina y Orexina A) y anticuerpos (por ej., Infliximab, Cetuximab, Rituximab, Trastuzumab, Bevacizumab, Panitumumab, Adalimumab, Ranibizumab). Los residuos de glutamina y ácido glutámico N-terminal pueden ciclar espontáneamente para convertirse en piroglutamato. Esta es una de las diferentes formas de extremos N terminales bloqueados que presentan un problema de secuenciación del extremo N-terminal cuando se usa la química de Edman, la cual requiere un grupo amino primario libre no presente en el ácido piroglutámico. La enzima piroglutamato aminopeptidasa puede restaurar un extremo N terminal libre escindiendo el residuo piroglutamato.

Tal y como se usa en el presente documento, un "proceso de purificación", se refiere a un proceso o a una serie de procesos destinados a aislar una proteína de una mezcla compleja. La proteína puede consistir en una o más isoformas, es decir, muestra heterogeneidad. El término "proceso de purificación" abarca sin limitación purificación de proteínas y anticuerpos. El material de partida es generalmente un cultivo celular (por ej., un cultivo de células de mamífero, un cultivo de levaduras o un cultivo de microorganismos) y las diferentes etapas en el proceso de purificación pueden liberar la proteína de una matriz en la que está confinada, separar la proteína y las partes no proteicas de la mezcla y, por último, separar la proteína deseada del resto de las demás proteínas. En el caso de que la proteína sea un anticuerpo, la separación típica comprende una cromatografía de afinidad con proteína A, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, interacción hidrófoba y/o cromatografía con hidroxiapatita.

El término "anticuerpo" tal y como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de inmunoglobulina compuesta por cuatro cadenas de proteína, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviado en el presente documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada (CH). La región constante de la cadena pesada está comprendida por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está comprendida por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir a su vez en regiones de

hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CRD), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones altamente conservadas (en inglés "*framework regions*") (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. El anticuerpo incluye, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, los fragmentos Fab y Fv de cadena sencilla (scFv) de los mismos, anticuerpos bioespecíficos, heteroconjugados, anticuerpos humanos y humanizados. Dichos anticuerpos pueden producirse de varias maneras, incluyendo cultivos de hibridoma, expresión recombinante en cultivos de células de mamífero o bacterias y expresión recombinante en animales transgénicos. También se pueden producir anticuerpos seleccionando una secuencia de una librería de secuencias expresadas en sistemas de expresión, tales como fagos filamentosos, bacterias, levaduras o ribosomas. Existen abundantes guías en la literatura para seleccionar una metodología de producción concreta, por ej., Chadd and Chamow, Curr. Opin. Biotechnol., 12:188-194 (2001). La elección de una metodología de fabricación depende de varios factores, incluyendo la estructura deseada del anticuerpo, la importancia de las porciones carbohidrato en los anticuerpos, la facilidad de cultivo y purificación y el coste. Se pueden generar muchas estructuras diferentes de anticuerpos utilizando la tecnología de expresión estándar, incluyendo anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y Fv, así como anticuerpos quiméricos que comprenden componentes de diferentes especies.

El término "producto farmacéutico", tal y como se usa en el presente documento significa una forma de dosificación que comprende un principio farmacéutico activo (API) adecuado para la administración a un mamífero, tal como un sujeto humano, donde dicha forma de dosificación puede contener portadores y/o excipientes adecuados y que se usa en ensayos clínicos o está aprobado para comercialización por una autoridad nacional, regional o internacional. Los productos farmacéuticos que comprenden una proteína, por ej., una proteína o un anticuerpo, preparados mediante cualquiera de los procedimientos de la presente invención se pueden preparar mediante técnicas convencionales, por ej., como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, editado por E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19ª edición, Easton, Pa. Los productos farmacéuticos pueden aparecer en formas convencionales, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, pastas o polvos liofilizados, aerosoles, soluciones, suspensiones o

aplicaciones tópicas, en particular como inyecciones, tales como inyecciones subcutáneas o intravenosas. El producto farmacéutico se puede encontrar en una variedad de formulaciones farmacéuticas aceptables y puede combinarse con uno o más portadores fisiológicamente aceptables. El portador o diluyente farmacéutico empleado puede ser un portador o diluyente sólido o líquido convencional. Ejemplos de portadores sólidos son lactosa, tierra alba, sacarosa, ciclodextrina, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico o éteres de alquilo corto de celulosa. Ejemplos de portadores líquidos son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, fosfolípidos, esteroides, ácidos grasos, aminas de ácido graso, polioxietileno, soluciones tampón isotónicas, agua y solución salina estéril.

DIBUJOS

Figura 1: Esta Figura muestra una representación esquemática del mecanismo de formación de ácido piroglutámico durante la ciclación de la glutamina y ácido glutámico N-terminal.

Figura 2: Esta Figura muestra los perfiles de la cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio catiónico (IEX-HPLC) de dos lotes comerciales de Rituximab Ref de Lote M86188 y Ref de Lote B6109B01, así como de la preparación de Rituximab D83 BSR4 producido aquí. En el perfil del cromatograma se indican los pre-picos, el pico principal y los post-picos. Se encontró que el pico principal consistía en moléculas de Rituximab que carecían de los dos residuos de lisina en el extremo C terminal y que tenían los 4 residuos de glutamina convertidos en piroglutamato. Se vio que las diferencias significativas entre la aparición de los post-picos de las preparaciones de anticuerpo Rituximab disponible comercialmente y el de la preparación de Rituximab D83 BSR4 producida aquí, eran causadas principalmente por la ciclación incompleta de residuos de glutamina N-terminal.

Figura 3: Esta Figura muestra cuatro gráficos que representan la correlación entre el área total de pico en AEX (intercambio aniónico) y CEX (intercambio catiónico) y el tiempo de incubación a diferentes temperaturas. Los gráficos superiores corresponden a la incubación a temperatura ambiente y los gráficos inferiores a la incubación a 37 °C. FT corresponde al flujo continuo de la cromatografía.

Figura 4: Esta Figura muestra la cinética de conversión de las isoformas post-picos de Rituximab en la isoforma del pico principal a temperatura ambiente (paneles superiores), a 37°C (paneles centrales) y a 45 °C (paneles inferiores) a una concentración baja de proteína (1,85 mg/ml; paneles de la izquierda), a una

concentración media de proteína (3,7 mg/ml; paneles centrales) y a una concentración alta de proteína (9,25 mg/ml; paneles de la derecha) en una solución con adición de fosfato de sodio 35 mM y con pH ajustado a 6,25.

Figura 5: Esta Figura muestra el efecto de diferentes concentraciones de fosfato (30, 60 y 90 mM), concentraciones de cloruro sódico (50 y 25 mM) a pH 5,8 y 6,2 sobre la cinética de conversión de las isoformas post-pico de Rituximab en la isoforma del pico principal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA LA INVENCION

Los presentes inventores han descubierto que introduciendo una etapa de incubación/conversión de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico durante un proceso de purificación de una proteína que tiene un residuo de glutamina y/o de ácido glutámico N-terminal, se puede manejar el nivel de heterogeneidad, tal como reducir hasta los niveles deseados y al mismo tiempo aumentar el rendimiento de la proteína deseada.

La glutamina y ácido glutámico N-terminal de una proteína puede sufrir ciclación formando un piroglutamato tal y como se muestra en la Figura 1. Durante la ciclación de la glutamina, la amina primaria N-terminal (cargada positivamente a un pH neutro) se convierte en una amida neutra, lo que tiene como resultado un cambio de la carga neta de la proteína. La reacción va acompañada de una pérdida de amoníaco (17 Da) y, por consiguiente, la ausencia de ciclación se puede detectar como variantes básicas por cromatografía de intercambio catiónico, ya que el pico principal es generalmente la especie totalmente cicada o como picos de elución tardía por HPLC de fase inversa debido a la mayor hidrofobicidad después de la pérdida de la amina N-terminal.

La ciclación del ácido glutámico se produce a través del grupo carboxilo de la cadena lateral y de la amina N-terminal, formando así una amida neutra y liberando agua (18 Da). La carga neta sigue siendo la misma debido a que condensan en la reacción un grupo ácido y uno básico, sin embargo, la pérdida de dos residuos cargados aumenta la hidrofobicidad de la molécula, lo que permite la detección por HPLC de fase inversa.

Dado que muchos anticuerpos humanos contienen un residuo de ácido glutámico y/o glutamina en su extremo N terminal, la formación de piroglutamato podría, por lo tanto, ocurrir durante la preparación de muchos anticuerpos clínicamente importantes y muy frecuentemente esto conduce a la heterogeneidad del anticuerpo expresado, el cual puede diferir de un lote a otro debido a ligeras variaciones en las condiciones de producción y purificación. Lo mismo aplica a las

proteínas, incluyendo los polipéptidos, ya que este es un problema importante en la producción de proteínas a gran escala, como es la escala industrial.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de conversión de un residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de una proteína en ácido piroglutámico en un proceso de purificación, que comprende una etapa de incubación de la proteína en condiciones que promueven la ciclación del residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de purificación de una proteína que contiene un residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal, comprendiendo el procedimiento una etapa de conversión del residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de dicha proteína en ácido piroglutámico N-terminal. Dicha conversión se realiza en condiciones que promueven la ciclación del residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal.

Tal y como se usa en el presente documento el proceso de purificación se puede realizar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y variará dependiendo de la proteína específica. Los esquemas de purificación de proteínas se han basado en diferencias en las propiedades moleculares de tamaño, carga y solubilidad entre la proteína a purificar y los contaminantes de proteína no deseados. Los protocolos basados en estos parámetros incluyen la cromatografía de exclusión por tamaño, la cromatografía de intercambio iónico, la precipitación diferencial, y similares.

Los procesos para la purificación de anticuerpos se basan generalmente en la cromatografía de afinidad por captura, generalmente la cromatografía de afinidad con proteína A. La cromatografía de afinidad con proteína A se refiere a la separación o purificación de sustancias y/o partículas usando la proteína A, donde la proteína A generalmente se encuentra inmovilizada en una fase sólida. El proceso de cromatografía de afinidad con proteína A va seguido generalmente de etapas de cromatografía de intercambio iónico y/o de interacciones hidrófobas y/o en modo mixto. Dichos procesos generalmente incluyen también al menos dos etapas de reducción de virus, generalmente la reducción a pH bajo en elución de la etapa de afinidad e implementación de un filtro de virus en una posición adecuada del proceso. Las impurezas eliminadas durante los procesos de purificación de anticuerpos incluyen mitad-anticuerpos (en inglés "*half antibodies*"), fragmentos de anticuerpos, dímeros y agregados, ADN, virus, HCP (proteínas de células del hospedador), fugas de proteína A, endotoxinas y otras impurezas relevantes.

En una realización de la presente invención la proteína se selecciona de una enzima, una hormona o un anticuerpo. Ejemplos adecuados de una proteína incluyen cualquier proteína que contiene uno o más residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal, incluyendo, bacteriorodopsina, fibrinógeno, colágeno, quininas, neurotensina, gastrina, apelina y orexina A, un anticuerpo o fragmentos de anticuerpos. Ejemplos de anticuerpos incluyen, sin limitación, Trastuzumab, Infliximab, Basiliximab, Daclizumab, Adalimumab, Omalizumab, Gemtuzumab, Rituximab, Bevacizumab, Cetuximab, Ofatumumab, Veltuzumab, Ocrelizumab, Panitumumab, Ranibizumab, Ibritumomab, Tiuxetan, Abciximab, Eculizumab, Alemtuzumab, Ozogamicina, Efalizumab, Palivizumab, Natalizumab, Omalizumab y Tocilizumab.

En otra realización de la presente invención el anticuerpo es Trastuzumab que tiene la secuencia de la cadena ligera SEC ID N°: 3 y las secuencias de la cadena pesada SEC ID N°: 4 y Bevacizumab que tiene la secuencia de la cadena ligera de SEC ID N°: 5 y las secuencias de la cadena pesada SEC ID N°: 6.

En todavía otra realización de la presente invención el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-CD20. Ejemplos adecuados de anticuerpos anti-CD20 incluyen Rituximab, Ofatumumab, Veltuzumab u Ocrelizumab.

En una realización preferida de la presente invención el anticuerpo es una secuencia idéntica a Rituximab, tal como Rituximab.

En todavía otra realización de la presente invención la proteína comprende una secuencia idéntica a las secuencias de cadena ligera y pesada de Rituximab, es decir, a la secuencia SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2, respectivamente.

En todavía otra realización de la presente invención la proteína comprende una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad, tal como 95%, 97%, 98%, 99% de identidad con la SEC ID N°: 1 y que tiene al menos un 90% de identidad, tal como 95%, 97%, 98%, 99% de identidad con la SEC ID N°: 2.

En todavía otra realización de la presente invención la proteína tiene de 1 a 4 residuos de glutamina N-terminal y/o de 1 a 4 residuos de ácido glutámico N-terminal antes de la conversión. Por lo tanto, si la proteína es una proteína de una sola cadena, esta puede contener un residuo de glutamina N-terminal o un residuo de ácido glutámico N-terminal. Sin embargo, si la proteína consiste en más de una subunidad, esta puede contener un residuo de glutamina N-terminal y un residuo de ácido glutámico N-terminal o dos residuos de glutamina N-terminal o dos residuos de ácido glutámico N-terminal. Como se ha explicado anteriormente, los anticuerpos comprenden cuatro cadenas de polipéptido (es decir, subunidades),

dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectada por puentes disulfuro. Cada secuencia de cadena pesada puede codificar para un residuo de glutamina N-terminal o un residuo de ácido glutámico N-terminal. De modo similar, cada secuencia de cadena ligera puede codificar para un residuo de glutamina N-terminal o un residuo de ácido glutámico N-terminal. Por consiguiente, en otras realizaciones, la proteína es un anticuerpo que tiene 2 ó 4 residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal a convertir de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, seleccionados de 2 residuos de glutamina N-terminal, 4 residuos de glutamina N-terminal, 2 residuos de ácido glutámico N-terminal, 4 residuos de ácido glutámico N-terminal o 2 residuos de glutamina N-terminal y 2 residuos de ácido glutámico N-terminal.

La conversión de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico puede producirse espontáneamente o puede estar facilitada por una enzima, tal como la glutaminil ciclasa. La glutaminil ciclasa está implicada en la ciclación de la glutamina y el ácido glutámico de varias hormonas peptídicas y proteínas y se ha detectado la actividad enzimática en diferentes tejidos. También se ha detectado la ciclación espontánea de la glutamina y del ácido glutámico en anticuerpos purificados conservados a temperaturas elevadas (Schilling et al., FEBS Lett., 2004, 563,191–196; Kumar and Bachhawat, Current Science, Vol. 102, No. 2, 25 de enero de 2012).

En una realización de la presente invención la conversión de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico es una conversión no enzimática. En general, la conversión no enzimática tiene lugar a temperaturas elevadas, durante periodos de tiempo adecuados y también las variaciones de pH pueden contribuir a la conversión. Cualquiera de estos parámetros se considera una realización de la presente invención, así como cualquier combinación de dos o tres de estos parámetros.

Temperaturas adecuadas para la conversión de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico están en el intervalo de 20-50 °C, tal como de 25-45 °C, tal como de 35-40 °C, por ej., 37 °C. Períodos de tiempo adecuados para la conversión de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico están en el intervalo de 4 a 120 horas, tal como de 12 a 96 horas, tal como de 24 a 72 horas, por ejemplo, de 8 a 48 horas.

Intervalos de pH adecuados para la conversión de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico están en el intervalo de 3,5-9,0, tal como de 4,0-8,0, tal como de 4,5-7,5, tal como de 5,0-7,0, tal como de 5,8-6,5, por ejemplo a pH 6,2.

En una realización típica de la presente invención la conversión tiene lugar a una temperatura de 20-50 °C durante 4 a 120 horas, tal como a una temperatura de 30-45 °C, por ej., 37-40 °C durante 12 a 72 horas.

La conversión no enzimática de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico puede ocurrir en varios medios diferentes. Se pueden seleccionar medios adecuados en los cuales la proteína está en solución o suspensión de entre agua, medios celulares, un tampón, tal como un tampón fosfato, un tampón Tris-HCl o un tampón de carbonato amónico. La conversión también puede tener lugar mientras la proteína está unida a una resina de cromatografía o membrana durante el proceso de purificación.

Generalmente, la conversión no enzimática de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico puede ocurrir en una solución, tal como un tampón fosfato.

En todavía otra realización de la presente invención la conversión se lleva a cabo en medios celulares.

En otra realización de la presente invención la conversión se lleva a cabo en un tampón, tal como tampón fosfato o tampón de carbonato amónico.

Generalmente, la conversión no enzimática de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico se puede realizar en una proteína derivada de un biorreactor de producción a gran escala que puede contener más de 50 L de medio celular después de haber sido cosechado y parcialmente purificado. La conversión se puede realizar generalmente en un volumen de 10 ml a 10 L en condiciones estáticas o con agitación moderada y en una realización de la presente invención la conversión se lleva a cabo en un volumen de al menos 10 ml.

Medios adecuados particulares para la conversión no enzimática de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico son medios que comprenden una concentración de tampón de 5 a 150 mM, tal como de 10 a 125 mM, tal como de 25 a 100 mM. El tampón también puede contener una sal, tal como NaCl, que tiene una concentración en el intervalo de 5 a 150 mM, tal como de 10 a 125 mM, tal como de 25 a 100 mM, tal como de 50 to 85 mM.

En otra realización más de la presente invención la concentración del tampón para la conversión no enzimática de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico se selecciona del intervalo de 20 mM a 150 mM. En una realización típica de la presente invención la concentración del tampón es de aproximadamente 90 mM.

Tampones particulares preferidos son un tampón fosfato 35 mM con NaCl 75 mM a pH 3,5, un tampón fosfato 35 mM con NaCl 75 mM a pH 6,2, un tampón Tris-HCl 100 mM a pH 7,0, un tampón de carbonato de amonio 100 mM a pH 8,6, un tampón fosfato 35 mM a pH 6,2, un tampón fosfato 35 mM con NaCl 75 mM a pH 6,2, un tampón fosfato 60 mM con NaCl 50 mM a pH 6,2, un tampón fosfato 60 mM con NaCl 25 mM a pH 6,2, un tampón fosfato 90 mM con NaCl 25 mM a pH 6,2 o un tampón fosfato 90 mM con NaCl 50 mM a pH 6,2.

La tasa de conversión de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico puede variar dependiendo del tampón seleccionado, de la temperatura a la que tiene lugar la conversión y el período de tiempo durante el cual se permite que tenga lugar la conversión. El experto sabrá identificar las condiciones que conducen a la conversión óptima sin resultar en degradación o modificaciones postraduccionales no deseadas. En muchos casos, será una ventaja conseguir la mayor cantidad posible de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal convertido en ácido piroglutámico.

En una realización de la presente invención la conversión de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico alcanza al menos el 50% es decir, al menos el 50% de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en la proteína es ácido piroglutámico. Por ejemplo, una proteína o anticuerpo que tiene dos residuos de glutamina N-terminal puede resultar tras la conversión en una composición heterogénea que comprende la proteína con 0, 1 ó 2 ácido(s) piroglutámico, siempre y cuando el número total de residuos de ácido piroglutámico en la composición de la proteína sea 50% o más.

En otra realización de la presente invención la conversión de la glutamina y/o

ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico alcanza al menos el 53% tal como del 53% al 68%.

En otra realización más de la presente invención la conversión de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico alcanza al menos un 68%, tal como al menos un 75%, tal como al menos un 80%, tal como al menos un 85%, tal como al menos un 90%, tal como al menos un 95%, tal como al menos un 99%.

El experto en la materia sabe identificar y medir la cantidad de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal que se ha convertido en ácido piroglutámico. No obstante, se describen métodos adecuados para la medición de los niveles de formación de ácido piroglutámico en Lyubarskaya et al. 2006 (*Analytical Biochemistry* 348, 24–39) y en Dick et al. 2007 (*Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 97, N° 3, 15 de junio de 2007). La determinación directa de la glutamina N-terminal ciclada también se ha realizado recientemente utilizando espectrometría de masas Q-TOF con electronebulización (Gadgil et al., 2006 *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17: 867–872.).

Como se ha descrito anteriormente, los procedimientos para purificar anticuerpos generalmente están basados en la cromatografía de afinidad, generalmente cromatografía de afinidad con proteína A, seguido de las etapas de cromatografía de intercambio iónico e incluye las etapas de reducción de virus en posiciones adecuadas del proceso.

En otra realización del procedimiento de la presente invención, el procedimiento comprende además las etapas: una captura con proteína A en una resina adecuada, una cromatografía de intercambio aniónico y una cromatografía de intercambio catiónico con una resina adecuada en donde la etapa de conversión tiene lugar antes de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico, preferiblemente inmediatamente antes de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico.

En todavía otra realización del procedimiento de la presente invención, el procedimiento comprende las etapas:

- (a) captura con proteína A en una resina adecuada,
- (b) una inactivación viral a pH bajo,
- (c) una cromatografía de intercambio aniónico,
- (d) la conversión de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de la proteína en ácido piroglutámico,
- (e) una cromatografía de intercambio catiónico con una resina adecuada y una

elución en gradiente para separar las isoformas del producto,

(f) una filtración viral y

(g) una ultrafiltración/diafiltración (UF/DF).

En todavía otra realización del procedimiento de la presente invención las etapas (a) – (g) se siguen en ese orden específico.

En otra realización del procedimiento de la presente invención se incluye una etapa de enfriamiento pasivo después de la etapa (d), generalmente antes de la etapa (e).

En el contexto de la presente invención la etapa (a) de captura con proteína A se puede realizar utilizando cualquier medio o filtro de resina con proteína A adecuado. La proteína A es una proteína de la pared celular bacteriana que se une a las IgG de mamíferos principalmente a través de sus regiones Fc. En su estado nativo, la proteína A tiene cinco dominios de unión a IgG, así como otros dominios con función desconocida. Existen varias fuentes comerciales de resinas con proteína A. El experto en la materia sabe cuál podría ser el medio o filtro de resina con proteína A adecuado y cuál podría ser también un medio o filtro, resina con proteína A modificado. Sin embargo, un medio o filtro, resina con proteína A incluye, pero sin limitarse a, MabSelect™ Sure de GE Healthcare y ProSep Ultra Plus™ de Millipore. Un ejemplo no limitativo de una columna adecuada empaquetada con MabSelect™ que se puede usar para purificaciones más extensas puede ser, por ejemplo, una columna de 20 cm x 21 cm, cuyo volumen de lecho es de aproximadamente 6,6 L. Independientemente de la columna, la columna se puede empaquetar usando una resina adecuada tal como MabSelect™ o ProSep Ultra Plus™.

En el contexto de la presente invención la etapa de captura con proteína A se realiza generalmente en modo de unión/elución cargando una solución de cosecha clarificada en la resina que se une la proteína. El experto en la materia también sabe cuáles podrían ser las condiciones de lavado adecuadas para eliminar impurezas del medio o resina con proteína A. Sin embargo, los tampones de lavado frecuentemente se seleccionan de tampones que comprenden de 20-100 mM Tris y de NaCl 20 a 1,0M que tiene un pH de 7,0-8,0. Un ejemplo de tampón de elución adecuado puede ser un tampón de elución que comprende acetato aproximadamente 200 mM, NaCl 50 mM y que tiene un pH de aproximadamente 3,5.

Las proteínas se pueden expresar en diferentes células que incluyen bacterias, tales como E. coli y Bacillus, levaduras tales como Saccharomyces, Pichia,

Aspergillus, *Fusarium* y *Kluyveromyces*, Algae, células vegetales, células de insecto y células de mamífero, tales como células CHO (ovario de hámster chino), hibridomas, células de BHK (riñón de cría de hámster), células de mieloma, célula HEK-293, células linfoblastoides humanas y una célula de ratón. Muchas proteínas complejas, tales como los anticuerpos frecuentemente se expresan en células CHO, células de mieloma murino, tales como las células NSO y NS1 o en células de retinoblastos embrionarios humanos, tales como PER.C6™. Dado que dichas células de mamífero contienen partículas de tipo retroviral endógenas, se requiere una etapa de inactivación retroviral, tal como la etapa b) para la producción de proteínas basada en células de mamífero destinadas al uso clínico. El experto sabe cómo realizar el paso de inactivación retroviral. Sin embargo, la inactivación viral frecuentemente se realiza en el eluato de la etapa de captura con Proteína A reduciendo el pH del eluato de la etapa de captura con Proteína A. Por lo tanto, el pH del eluato se puede reducir hasta un pH en el intervalo de 3,0-4,0 durante un período de 5 minutos a 24 horas, tal como de 3,1 a 4, por ejemplo de 3,2 to 4, tal como de 3,3 a 4, por ejemplo de 3,4 a 4, tal como de 3,5 a 4, por ejemplo de 3,6 a 4, tal como de 3,7 a 4, por ejemplo de 3,8 a 4, tal como a un pH de 4 o de 3 a 3,9, tal como de 3,1 a 3,9, por ejemplo de 3,2 a 3,9, tal como de 3,3 a 3,9, por ejemplo de 3,4 a 3,9, tal como de 3,5 a 3,9, por ejemplo de 3,6 a 3,8, por ejemplo, a un pH de 3,6.

Como se ha señalado antes, el eluato de la etapa de captura con proteína A se puede mantener en cualquiera de estos valores de pH desde un período de 5 minutos a 24 horas tal como de 10 minutos a 240 minutos, tal como por ejemplo de 20 a 90 minutos y el eluato de la etapa de purificación por afinidad con proteína A se puede filtrar antes de dicha reducción del valor del pH y/o después de reajustar el pH. Al final de la etapa de inactivación viral a bajo pH, el producto se puede neutralizar y ajustar según necesidad para proseguir con el procesamiento. Por ejemplo, el pH del eluato se puede ajustar hasta un pH de 7,5 a 8,5.

La etapa de captura con proteína A puede ir seguida de una etapa de cromatografía de intercambio aniónico que funciona en el modo de columna con un caudal determinado o en modo de operación por lotes, sumergiendo la resina de intercambio iónico en la solución muestra ligeramente agitada y cambiando posteriormente los medios líquidos por filtración. Sin embargo, en una realización preferida, esta cromatografía de intercambio aniónico etapa c) es una etapa de cromatografía aniónica que funciona en modo de flujo continuo. En este sentido, el experto sabe cómo definir las condiciones adecuadas de pH y fuerza iónica para

cargar el primer intercambiador iónico, condiciones que tienen como resultado la retención del anticuerpo en el flujo continuo mientras que las partículas virales inactivadas y otras impurezas se quedan unidas a la resina aniónica y, así se eliminan de la solución de anticuerpo.

Ejemplos de medio, filtro o resina de cromatografía de intercambio aniónico adecuados son conocidos en el estado de la técnica e incluyen resinas y perlas a base de agarosa, perlas de dextrano, perlas de poliestireno y resinas de poliestireno/divinil benceno. Preferiblemente, la resina de intercambio aniónico es un intercambiador aniónico a base de amina cuaternaria montado sobre una matriz de agarosa, tal como por ej., Sepharose CL-6B o Sepharose Fast Flow (FF) de Amersham-Biosciences/Pharmacia. Ejemplos de estos son Sepharose Q de Amersham-Biosciences/Pharmacia, Sartorius Sartobind Q o Pall Mustang Q. Un material de intercambio aniónico preferido es la resina Q-Sepharose Fast Flow de GE Healthcare.

El tampón para equilibrar en la cromatografía de intercambio aniónico de acuerdo con la presente invención preferiblemente tiene una concentración de sal de una sal de desplazamiento, tal como por ej., cloruro sódico en el intervalo de 1 a 150 mM, más preferiblemente de 5 a 110 mM, lo más preferiblemente de 20 a 100 mM de sal. El pH del tampón para equilibrar está preferiblemente en el intervalo de pH 6,5 a pH 9,0, más preferiblemente está en el intervalo de pH 7,5 a pH 8,5, lo más preferiblemente está en el intervalo de pH 7,9 a pH 8,2. El tampón para equilibrar de acuerdo con la presente invención preferiblemente contiene Tris en el intervalo de 1 a 100 mM, más preferiblemente de 5 a 50 mM, lo más preferiblemente Tris de 10 a 30 mM. Preferiblemente la conductividad del tampón para equilibrar de acuerdo con la presente invención está por debajo de 10 mS/cm a pH 8,0.

De acuerdo con la presente invención la primera etapa de cromatografía de intercambio aniónico va seguida generalmente de una etapa de conversión en piroglutamato para permitir la conversión de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal no ciclados en piroglutamato. Se han descrito más arriba las condiciones adecuadas para la conversión de un residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de una proteína en ácido piroglutámico en un proceso de purificación se han descrito más arriba. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención la conversión de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en piroglutamato puede ir seguida de una etapa opcional de enfriamiento si la conversión se ha llevado a cabo a una temperatura superior a aproximadamente 25 °C. Esta etapa de enfriamiento se puede realizar mediante

un proceso de enfriamiento activo, es decir, por ejemplo, usando un proceso de enfriamiento a base de agua o un intercambiador de calor de flujo continuo; o un proceso de enfriamiento pasivo, es decir, uno en el que no se usan componentes mecánicos que consuman energía como bombas y ventiladores para disminuir la temperatura. El proceso de enfriamiento puede continuar hasta que la solución de conversión resultante haya alcanzado una temperatura de aproximadamente 18 a 30 °C. El proceso de enfriamiento se puede llevar a cabo durante un período de tiempo en el intervalo de 1 a 120 horas, tal como de 12 a 96 horas, tal como de 24 a 72 horas, por ejemplo de 24 a 48 horas. En una realización preferida de la presente invención la conversión comprende una etapa de enfriamiento pasivo durante 12 a 72 horas.

Al final de la etapa de conversión en piroglutamato, las condiciones del tampón se pueden ajustar según necesidad para proseguir con el proceso. Por ejemplo, el pH de la solución de conversión se puede ajustar hasta un pH de aproximadamente 5,5 con ácido acético.

De acuerdo con la presente invención una cromatografía de intercambio catiónico con una resina y un gradiente de elución adecuados para separar las isoformas del producto pueden seguir la etapa de conversión en piroglutamato. Ejemplos adecuados de intercambiador catiónico incluyen S-SepharoseFF o SP-SepharoseHP (Pharmacia), SP-SepharoseFF (Sigma) y Poros HS50 (Applied Biosystems). Un intercambiador catiónico preferido es Poros HS50 de Applied Biosystems.

La solución de proteína de la etapa de conversión en piroglutamato se puede ajustar a un pH de aproximadamente 5,5 con ácido acético y cargarse en el intercambiador catiónico. Tampones de lavado adecuados contienen acetato sódico en el intervalo de 5 a 50 mM y NaCl en el intervalo de 5 a 50 mM y pueden tener un pH en el intervalo de 5,0 a 7,0. La proteína unida se puede eluir usando una elución en gradiente de 15 a 180 mM de NaCl en 13 lavados de columna en numerosas fracciones. Tras la elución, las fracciones de proteína se pueden analizar y combinar.

Una ventaja especial de realizar la etapa de conversión antes de una etapa de cromatografía de intercambio catiónico es que la carga diferente de la especie de conversión. Así, la molécula de proteína en donde la glutamina N-terminal no está totalmente convertida en ácido piroglutámico está más positivamente cargada. En consecuencia, un anticuerpo que, por ejemplo, tiene 4 residuos de glutamina N-terminal donde una fracción del anticuerpo tiene un residuo de glutamina N-

terminal convertido en ácido piroglutámico y una segunda fracción con dos residuos de glutamina N-terminal convertidos en ácido piroglutámico y una tercera fracción con tres residuos de glutamina N-terminal convertidos en ácido piroglutámico y una cuarta fracción donde todos los residuos de glutamina N-terminal están convertidos en ácido piroglutámico conducirá a cuatro isoformas diferentes con cuatro cargas diferentes. Dichas isoformas cargadas de forma diferente se pueden separar por cromatografía de intercambio catiónico y se pueden extraer las isoformas no preferidas.

De acuerdo con la presente invención se realiza una etapa de filtración viral después de la etapa de intercambiado de cationes. La inactivación viral se puede conseguir mediante el uso de filtros adecuados. Aunque determinadas realizaciones de la presente invención emplean dichos filtros durante la fase de recuperación principal, en otras realizaciones se emplea en otras fases del proceso de purificación, incluyéndola como la penúltima etapa o la etapa final de la purificación. En determinadas realizaciones, se emplean filtros alternativos para la inactivación viral, tal como, pero sin limitarse a, filtros Viresolve™ (Millipore), filtros Zeta Plus VR™ (CUNO), filtros Planova™ (Asahi Kasei Pharma) y filtro Ultipor DV50™ de Pall Corporation. Una lista preferida es un filtro destinado a parvovirus Planova 20N.

Tras la filtración viral, la solución de proteína se somete a ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) para concentración e intercambio de tampón. El intercambio de tampón se puede realizar por filtración en flujo tangencial (TFF) utilizando una membrana de corte de peso molecular de 30 kDa y dialfiltración en una versión libre de detergente del tampón de formulación final.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de preparar una proteína que tiene un ácido piroglutámico N-terminal para un producto farmacéutico, en donde el procedimiento comprende un procedimiento para la conversión de un residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de una proteína en ácido piroglutámico en un proceso de purificación, comprendiendo el proceso de purificación una etapa de incubación de la proteína en condiciones que promueven la ciclación del residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una proteína que tiene un ácido piroglutámico N-terminal como un API para un producto farmacéutico, en donde el procedimiento comprende un procedimiento de purificación de una proteína que contiene un residuo de

glutamina y/o ácido glutámico N-terminal, comprendiendo el procedimiento de purificación una etapa de conversión del residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de la proteína en ácido piroglutámico N-terminal en condiciones que promueven la ciclación del residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal.

Cualquiera de las realizaciones en relación con el primer o segundo aspecto de la presente invención también es una realización del tercer y cuarto aspectos.

En una realización, el producto farmacéutico comprende un anticuerpo, generalmente seleccionado de Trastuzumab, Infliximab, Basiliximab, Daclizumab, Adalimumab, Omalizumab, Gemtuzumab, Rituximab, Bevacizumab, Cetuximab, Ofatumumab, Veltuzumab, Ocrelizumab, Panitumumab, Ranibizumab, Ibritumomab, Tiuxetan, Abciximab, Eculizumab, Alemtuzumab, Ozogamicina, Efalizumab, Palivizumab, Natalizumab, Omalizumab y Tocilizumab. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20.

Todas las referencias, incluidas las publicaciones, solicitudes de patente y patentes citadas en el presente documento se incorporan aquí por referencia en la misma medida que si cada referencia estuviera individualmente y específicamente indicada para ser incorporada como referencia y se hubiera explicado en su totalidad.

Todos los títulos y subtítulos se usan en el presente documento sólo por conveniencia y no deberían considerarse como limitantes de la invención de ninguna manera.

Cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las variaciones posibles de los mismos está abarcada por la invención salvo que se indique otra cosa o claramente se contradiga por el contexto.

Los términos "un" y "una" y "el" y referentes similares como se usan en el contexto de la descripción de la invención deben interpretarse como que incluyen tanto el singular como el plural, salvo que se indique otra cosa o claramente se contradiga por el contexto. Por ej., "uno" o "una" significa "uno(a) o más".

La mención de los intervalos de valores en la presente memoria sólo se pretende que sirva como un procedimiento abreviado para referirse individualmente a cada valor individual que entra dentro del intervalo, salvo que se indique otra cosa en la presente memoria, cada valor individual está incorporado en la descripción como si he hubiera mencionado individualmente en la presente memoria. Salvo que se indique otra cosa, todos los valores exactos proporcionados en la presente memoria son representativos de los correspondientes valores aproximados (por ej., todos los valores ilustrativos exactos proporcionados con respecto a un factor

particular o medición se pueden considerar que también proporcionan una medición aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", cuando corresponda).

Todos los procedimientos descritos en la presente memoria se pueden realizar en cualquier orden adecuado salvo que se indique otra cosa en la presente memoria o claramente se contradiga por el contexto.

El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o texto ilustrativo (por ej., "tal como") proporcionado en el presente documento, se pretende que sea sólo para ilustrar mejor la invención y no supone ninguna limitación del alcance de la invención salvo que se indique de otra manera. Ningún vocabulario en la memoria debe interpretarse como indicativo de que cualquier elemento es esencial para la práctica de la invención, salvo que se indique explícitamente.

La mención e incorporación de los documentos de patente en la presente memoria se hace sólo por comodidad y no refleja ninguna opinión sobre la validez, patentabilidad y/o fortaleza de dichos documentos de patente.

La descripción del presente documento de cualquier aspecto o realización de la invención que utilice términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos se pretende que proporcione soporte a un aspecto o realización similar de la invención que "consiste en", "consiste esencialmente en" o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos en particular, salvo que se indique otra cosa o claramente se contradiga por el contexto (por ej., el procedimiento de conversión del procedimiento de purificación descrito en el presente documento que comprende una etapa particular debería entenderse como que también describe los procedimientos que consisten en esa etapa, salvo que se indique otra cosa o claramente se contradiga por el contexto).

Esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del objeto mencionado en los aspectos o reivindicaciones presentados en el presente documento hasta el máximo grado permitido por la ley aplicable.

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos que, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de protección. Las características descritas en la descripción anterior y en los siguientes ejemplos pueden, tanto por separado como por cualquier combinación de las mismas, ser material para llevar a cabo la invención en diversas formas de la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Se seleccionó una línea celular productora de CHO que expresa el anticuerpo monoclonal Rituximab (también conocido con el nombre comercial Rituxan) y se usó para producir el anticuerpo Rituximab en un biorreactor de un solo uso de 10 L con un diseño de tanque agitado usando un proceso de fermentación de lote alimentado (en inglés "*fed-batch*") directa.

Rituximab es un anticuerpo quimérico con un dominio variable de ratón y regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera kappa de IgG1 humana. Tanto las cadenas pesadas como las ligeras, de Rituximab tienen una glutamina en sus extremos N terminal (después de eliminar el péptido señal secretor) y las cadenas pesadas tienen una lisina en sus extremos C-terminales. Las glutaminas N-terminales pueden ciclar a ácido piroglutámico tanto por enzimas celulares como por conversión química, y el corte de la lisina C-terminal mediante carboxipeptidasas celulares es muy frecuente. Ambas modificaciones reducen el número de cargas positivas de la proteína y la heterogeneidad de estas modificaciones en los extremos N-terminal y C-terminal contribuyen a un complejo perfil de cromatografía líquida de alta resolución de intercambio catiónico (IEX-HPLC) (como se muestra en la Figura 2).

La muestra recogida aclarada se cargó primero en una etapa de cromatografía de afinidad con proteína A usando una resina MabSelect SuRe y se llevó a cabo en modo unión/elución. La resina MabSelect SuRe se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris 20 mM, NaCl 1M pH 8,0 y posteriormente con 2,5 volúmenes de columna de Tris 20 mM, NaCl 50 mM pH 8,0 antes de que el anticuerpo Rituximab unido se eluyese usando 4,5 volúmenes de columna de acetato 200 mM, NaCl 50 mM, pH $3,5 \pm 0,1$ y se sometiese a inactivación viral por incubación a un pH bajo durante 105 ± 15 minutos a temperatura ambiente.

Tras la inactivación viral, la solución se neutralizó a pH 8 usando Tris 0,6 M, NaCl 50 mM pH 8,5 y purificando adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico usando una resina Q-Sepharose Fast Flow que operó en modo de flujo continuo. Se sabe que este proceso proporciona una buena eliminación del ADN y viral. Basándose en la experiencia previa, se puede esperar una buena eliminación viral de AEX-FT a pH 8,0 si la conductividad es ≤ 10 mS/cm. Esto se puede lograr mediante dilución simple con agua para inyección (AI), pero con la consecuencia de aumentar el volumen del procedimiento y, por consiguiente, el tiempo de procesamiento. Para garantizar que una dilución doble simple resultaría de una forma fiable en una carga de AEX final inferior a 10

mS/cm, era deseable reducir a la mitad la concentración de los tampones de lavado A y de los de elución.

La solución de flujo continuo resultante se analizó por cromatografía líquida de alta resolución de intercambio catiónico (IEX-HPLC) en una columna Dionex Propac WCX-10 usando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución Agilent y se comparó con dos lotes diferentes de preparaciones de anticuerpo Rituximab comercializadas designadas como Lote Ref M86188 y Lote Ref B6109B01, como se muestra en la Figura 2.

Los resultados del mapeado peptídico por espectrometría de masas de ambas preparaciones de anticuerpo Rituximab comercializadas Lote Ref M86188 y Lote Ref B6109B01, así como la preparación de Rituximab D83 BSR4 producida en el presente documento mostraban que el pico principal de los ensayos de IEX-HPLC consistía en una molécula de Rituximab que carecía de los dos residuos de lisina C-terminal y los 4 residuos de glutamina convertidos en piroglutamato ciclado. Además, el análisis de IEX-HPLC reveló una diferencia significativa en la aparición de los post-picos de las preparaciones de anticuerpo Rituximab comercializadas en comparación con la preparación de Rituximab D83 BSR4 producida en el presente documento.

El análisis de la composición de los lotes de Rituximab mediante mapeado peptídico y espectrometría de masas reveló que las diferencias en la aparición de los post-picos entre la preparación de Rituximab comercializada y la preparación de Rituximab D83 BSR4 producida en el presente documento se debían principalmente a la ciclación incompleta de la glutamina N-terminal.

Una manera de reducir la cantidad de isoformas de Rituximab post-pico podría ser eliminar y desechar el producto con exceso de glutamina N-terminal libre durante la posterior etapa de purificación por intercambio catiónico. Sin embargo, dado que las isoformas de Rituximab post-pico representan hasta el 50% de las isoformas de Rituximab total en las preparaciones, tales como D83 BSR4, esto reduciría el rendimiento casi a la mitad.

Por consiguiente, se realizó un experimento posterior para identificar las condiciones óptimas que favorecerían la ciclación de la glutamina de la solución de intercambio aniónico a temperaturas razonables desde el punto de vista operativo para aumentar el rendimiento de la isoforma del pico principal de Rituximab.

Ejemplo 2

Las primeras condiciones a analizar eran simplemente para determinar si la

solución de intercambio aniónico de flujo continuo (AEX FT) o la posterior solución de carga de intercambio catiónico (CEX- Carga) promoverían la ciclación a temperatura ambiente o a 37 °C.

Se extrajeron muestras del final de la etapa de intercambio aniónico de flujo continuo (pH 8) y después de realizada la preparación para la carga de intercambio catiónico (pH 5,5), se recogieron alícuotas en tubos para replicados para diferentes momentos de tiempo y se mantuvieron a temperatura ambiente o a 37 °C. Periódicamente durante 13 días, se transfirió un tubo de cada condición a un congelador de -70°C y al final del ciclo de tiempo, todas las muestras se descongelaron y se analizaron mediante IEX-HPLC (Figura 3). (Se prepararon menos alícuotas de la carga de CEX para mantener la temperatura ambiente).

Como se muestra en la Figura 3, no se observó conversión de las isoformas de los post-picos de Rituximab en la isoforma del pico principal cuando se incubó la solución de Rituximab de AEX FT a temperatura ambiente o a 37 °C. Por el contrario, cuando el anticuerpo Rituximab se incubó con la solución de carga de CEX, se observó que las isoformas de los post-picos se convertían en la isoforma del pico principal tanto a temperatura ambiente como cuando se incubaba a 37 °C. Sin embargo, se vio que la tasa de conversión tanto a temperatura ambiente como a 37 °C era bastante lenta, de modo que el porcentaje total de post-picos se redujo en ~ 10% después de 8 días de incubación, lo que corresponde a ~ 20% de la cantidad inicial de los post-picos convertidos en el pico principal.

Ejemplo 3

Dick et al. (2007, Biotechnol, Bioeng. v97 p544) han descrito tasas de conversión mayores que las observadas en la presente invención en presencia de tampón fosfato 35 mM a pH 6,2. Así, se llevaron a cabo nuevos experimentos para investigar la cinética de la conversión a temperatura ambiente, a 37°C y a 45°C y también el efecto sobre la tasa de conversión que tendría que tener la concentración de la proteína.

La solución de Rituximab de AEX FT se mezcló con fosfato sódico 35 mM de una solución stock concentrada y se ajustó a pH 6,25 con ácido acético, ya que es el método más simple desde el punto de vista operativo para implementar en un proceso de fabricación.

La solución de fosfato de sodio de Rituximab de AEX FT se dividió en 3 alícuotas, de las que una se dejó inalterada a una concentración de 1,85 mg/ml de proteína mientras que las otras dos se concentraron 2x (paneles centrales) y 5x (paneles de la derecha) hasta aproximadamente 3,7 y 9,25 mg/ml usando un concentrador

spin Millipore 30 kDa MWCO. Cada muestra se filtró esterilizada con un filtro de jeringa de 0,2 μm y se tomaron subalícuotas que se introdujeron en tubos Eppendorf para puntos de tiempo individuales. Varias alícuotas réplica se mantuvieron a temperatura ambiente (fila superior), 37°C (fila central) y 45 °C (fila inferior) hasta 3 días (Figura 4). En los puntos temporales indicados, se transfirió un tubo de cada condición a 2-8 °C y al final del experimento, todas las muestras se analizaron conjuntamente en el mismo ensayo. Cada panel muestra el porcentaje de IEX-HPLC pre-picos, pico principal y post-picos a lo largo de la evolución temporal para cada condición de incubación. A modo de comparación, en el primer gráfico de cada fila se muestra el porcentaje de pre-picos, pico principal y post-picos de un patrón de referencia de Rituximab comercializado.

Los resultados mostraban (Figura 4) que la temperatura más alta aumentaba claramente tanto la conversión de ácido piroglutámico como la formación del pre-pico, aunque la conversión de ácido piroglutámico siempre era más rápida que la formación del pre-pico en cada condición. A 45 °C, el % de pico principal alcanzó un máximo de 60-70% el día 1 y comenzó a disminuir a medida que la formación del pre-pico superaba cualquier conversión post-pico adicional. A 37 °C, la conversión fue más lenta y el día 3 alcanzó el mismo % máximo de pico principal. Aunque a temperatura ambiente se apreciaba cierta conversión, la tasa de conversión a la temperatura era menos de la mitad que la observada a 37 °C. No se observó a ninguna temperatura un efecto obvio de la concentración de proteína.

Ejemplo 4

A continuación, se evaluó el efecto de la concentración de fosfato (30, 60, 90 mM), incluyendo variables de pH y factor de dilución (es decir, [NaCl] menor) que serían más propicias para la carga en la posterior columna de intercambio catiónico POROS HS50.

La solución de Rituximab de AEX-FT (D83) se diluyó dos veces con NaCl 50 mM (dando lugar a NaCl ~ 50 mM final – panel superior) o con agua para inyectables (AI) (dando lugar a NaCl ~ 25 mM final –panel inferior) y se mezcló con fosfato sódico de una solución stock concentrada para preparar una solución final de 30, 60 ó 90 mM, que se ajustó hasta pH 6,2 o pH 5,8 con ácido acético. Estas soluciones se incubaron durante 2 días a 37 °C y se analizaron por IEX-HPLC como en el Ejemplo 3. A modo de comparación, en cada gráfico se muestra el mismo patrón de referencia de Rituximab comercial y las muestras D83 control T=0.

Los resultados mostraron (Figura 5) que después de 2 días de incubación a 37 °C, una concentración más alta de fosfato daba lugar a una reducción ligeramente mayor en los post-picos y a un mayor aumento del pico principal. De modo similar, un pH 6,2 promovía una conversión ligeramente mejor que el pH 5,8. No se observaron diferencias aparentes entre usar NaCl 25 o 50 mM.

Aunque en este punto, todos los experimentos se llevaron a cabo en tubos pequeños en condiciones estáticas, los experimentos se repitieron en un modelo de matraz agitado, para que fuese relevante para la fabricación a gran escala, donde el mezclado se realizaría con un impulsor para garantizar una temperatura uniforme durante 3 días a 37 °C. Estos resultados confirmaron las observaciones previas obtenidas en el modelo estático más pequeño, salvo que la cinética de conversión era ligeramente más rápida con fosfato 90 mM en el modelo de matraz agitado.

Ejemplo 5

Se llevó a cabo un análisis del proceso de fabricación a escala completa incluyendo nanofiltración y todas las medidas de control microbiano utilizando un biorreactor de 500 L y purificado esencialmente como se ha descrito en el ejemplo 1. Tras incubar el anticuerpo Rituximab durante aproximadamente 28 horas a 37 °C, este se enfrió gradualmente hasta temperatura ambiente durante 48 horas. La solución de Rituximab resultante se cargó en una resina de cromatografía de intercambio catiónico POROS HS y se lavó con 4 volúmenes de columna de NaCl 15 mM, acetato 20 mM pH 5,5 y 5,5 volúmenes de columna de NaCl 15 mM, Nafosfato 20 mM pH 6,5. El anticuerpo Rituximab se eluyó usando un gradiente lineal de NaCl 15 a 180 mM para 13 volúmenes de columna con recogida de la fracción de 0,5 volúmenes de columna por fracción. La Tabla 1 siguiente muestra el contenido de proteína total de las fracciones 1 a 9 y el ensayo de IEX-HPLC de las fracciones individuales y de las fracciones combinadas 1 a 6, así como para una preparación de Rituximab comercializada designada referencia de Rituximab.

Como se puede ver en la Tabla 1, las fracciones combinadas 1 a 6 corresponden al 96% de la proteína totalmente eluida, es decir, Rituximab y el % de pre-pico, pico principal y post-picos (16,3; 63,0; 20,7) son bastante similares a la preparación de Rituximab comercializada (20,2; 66,5; 13,4). En otras palabras, la composición de isoformas de Rituximab de las fracciones combinadas 1 a 6 recuerda mucho a la preparación de Rituximab comercializada.

Esto es significativamente diferente de los resultados del experimento 1, donde la

cantidad de isoformas de Rituximab post-pico representaba hasta el 50% de las isoformas totales de Rituximab.

Tabla 1. Análisis de las fracciones de POROS HS50 para el análisis de la fabricación (10-0071).

Muestra	Proteína total por fracción (g)	% de proteína total	Resultados del ensayo de IEX HPLC		
			% pre picos	% pico principal	% post picos
Fracción 1	30	10%	61,9	35,1	3,0
Fracción 2	72	25%	26,9	69,3	3,9
Fracción 3	83	28%	9,0	79,7	11,3
Fracción 4	64	22%	3,3	62,8	33,9
Fracción 5	18	6%	1,6	16,7	81,7
Fracción 6	15	5%	0,0	4,6	95,4
Fracción 7	3	1,1%	0,4	4,8	94,7
Fracción 8	7	2,5%	0,0	3,9	96,1
Fracción 9	1	0,3%			
Fracción combinada 1-6			16,3	63,0	20,7
Referencia de Rituximab			20,2	66,5	13,4

Conclusiones

Como se ve en los Ejemplos 1 a 5, se ha desarrollado un proceso robusto y más reproducible para convertir residuos de glutamina o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico a escala de fabricación. El procedimiento está diseñado para reducir la variación entre lotes y para producir un producto que es similar en cuanto al perfil iónico a un producto comercializado.

El proceso está optimizado para la transferencia sencilla y rápida de una solución de intercambio aniónico de flujo continuo que contiene una proteína con residuos de glutamina N-terminal no ciclados en una composición que contiene cantidades óptimas de fosfato y NaCl que tiene un pH de aproximadamente 6,2 para la conversión no enzimática de residuos de glutamina N-terminal no ciclados en ácido piroglutámico dentro de un proceso de purificación.

BIBLIOGRAFÍA

Yu et al., 2006. Investigation of N-terminal glutamate cyclization of recombinant monoclonal antibody in formulation development. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42, 455–463.

Chelius et al., 2006 Formation of Pyroglutamic Acid from N-Terminal Glutamic Acid in Immunoglobulin Gamma Antibodies. *Anal. Chem.* 78, 2370-2376.

Dick et al., 2007. Determination of the Origin of the N-Terminal Pyro-Glutamate Variation in Monoclonal Antibodies Using Model Peptides. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 97, No. 3, June 15, 544-553.

Needleman and Wunsch 1970. Needleman-Wunsch Algorithm for Sequence Similarity Searches. *J. Mol. Biol.* 48: 443-453.

Rice et al., 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite *Trends Genet.* 16: 276-277.

Lyubarskaya et al. 2006. Analysis of recombinant monoclonal antibody isoforms by electrospray ionization mass spectrometry as a strategy for streamlining characterization of recombinant monoclonal antibody charge heterogeneity (*Analytical Biochemistry* 348, 24–39.

Gadgil et al., 2006: Improving mass accuracy of high performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry of intact antibodies. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17: 867–872.

Chadd and Chamow 2001. Therapeutic antibody expression technology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12:188-194.

Kumar and Bachhawat 2012. Pyroglutamic acid: throwing light on a lightly studied metabolite. *Current Science*, Vol. 102, No. 2, 25, 288-297.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MABXIENCE

<120> UN PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA FORMACIÓN DE ÁCIDO PIROGLUTÁMICO DE UNA PROTEÍNA<130> P2661PC00

<160> 6

<170> BISSAP 1.0

<210> 1

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..213

<223> /mol_tipo="proteina"
/nota="Anticuerpo"
/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 1

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

<210> 2

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..451

<223> /mol_tipo="proteina"
/nota="Anticuerpo"
/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450

<210> 3

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..214
 <223> /mol_tipo="proteina"
 /nota="Anticuerpo"
 /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 4
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..451
 <223> /mol_tipo="proteina"
 /nota="Anticuerpo"
 /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450

<210> 5

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..214

<223> /mol_tipo="proteina"

/nota="Anticuerpo"

/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 6

<211> 453

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..453

<223> /mol_tipo="proteina"

/nota="Anticuerpo"

/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 6

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

Leu	Met	Ile	Ser	245	Thr	Pro	Glu	Val	250	Thr	Cys	Val	Val	Val	255	Asp	Val	
Ser	His	Glu	Asp	260	Pro	Glu	Val	Lys	265	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	270	Asp	Gly	Val
Glu	Val	His	Asn	275	Ala	Lys	Thr	Lys	280	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	285	Tyr	Asn	Ser
Thr	290	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	295	Thr	Val	Leu	His	Gln	300	Asp	Trp	Leu
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	310	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	315	Pro	Ala	320
Pro	Ile	Glu	Lys	325	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	330	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	335
Gln	Val	Tyr	340	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	345	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	350	Lys	Asn	Gln
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	360	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	365	Ile	Ala	370
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	375	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	380	Thr	Thr	385
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	390	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	395	Leu	Leu	400
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	405	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	410	Cys	Ser	415
Val	Met	His	Glu	Ala	420	Leu	His	Asn	425	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	430	Leu	Ser	435
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	440									445				450

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la purificación de una proteína que contiene una glutamina N-terminal y/o un ácido glutámico N-terminal, comprendiendo el procedimiento una etapa de incubación de dicha proteína en condiciones que promueven la ciclación de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de dicha proteína a ácido piroglutámico.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la proteína es un anticuerpo.
3. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 en el que la proteína es un anticuerpo anti-CD20.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que el anticuerpo anti-CD20 comprende una secuencia de cadena ligera idéntica a SEC ID N° : 1 y una secuencia de cadena pesada idéntica a SEC ID N° : 2.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que la conversión tiene lugar a una temperatura de 20-45 °C.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en el que la conversión se lleva a cabo en medios celulares o en un tampón.
7. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que la concentración del tampón se selecciona del intervalo de 20 mM a 150 mM.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en el que el pH está en el intervalo de 3,5-9,0.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en el que la conversión de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico alcanza al menos el 50%.
10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en

el que la etapa de conversión comprende la conversión no enzimática de la glutamina y/o el ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico.

11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en el que la proteína tiene de 1 a 4 residuos de glutamina N-terminal y/o de 1 a 4 residuos de ácido glutámico N-terminal antes de la conversión.

12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que comprende además las etapas de una cromatografía con proteína A con una resina adecuada y una cromatografía de intercambio iónico con una resina adecuada.

13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en el que el procedimiento comprende las etapas:

- (a) captura con proteína A con una resina adecuada,
- (b) una inactivación viral a un pH en el intervalo de 3,0-4,0,
- (c) una cromatografía de intercambio aniónico,
- (d) la conversión de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de la proteína en ácido piroglutámico,
- (e) una cromatografía de intercambio catiónico con una resina adecuada y una elución en gradiente para separar las isoformas del producto,
- (f) una filtración viral y
- (g) una ultrafiltración/diafiltración (UF/DF).

14. El procedimiento de la reivindicación 13 que comprende una etapa de enfriamiento pasivo durante 12 a 72 horas después de la etapa (d).

15. Un procedimiento para preparar una proteína que tiene un ácido piroglutámico N-terminal como principio activo farmacéutico para un producto farmacéutico, comprendiendo el procedimiento un procedimiento de purificación de cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

RESUMEN

Un procedimiento para aumentar la formación de ácido piroglutámico de una proteína

Un procedimiento para la conversión de un residuo de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de una proteína en ácido piroglutámico en un procedimiento de purificación.

Figura 1

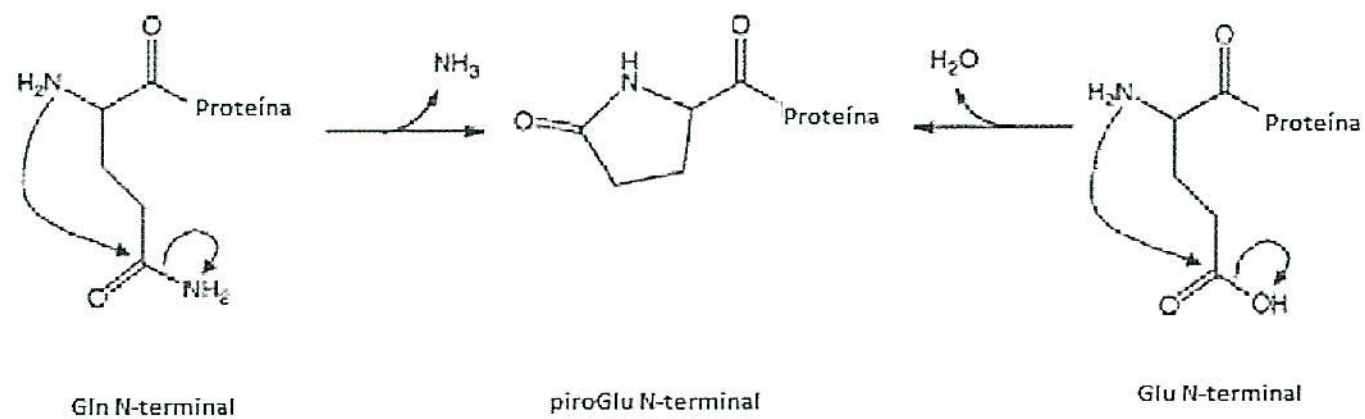
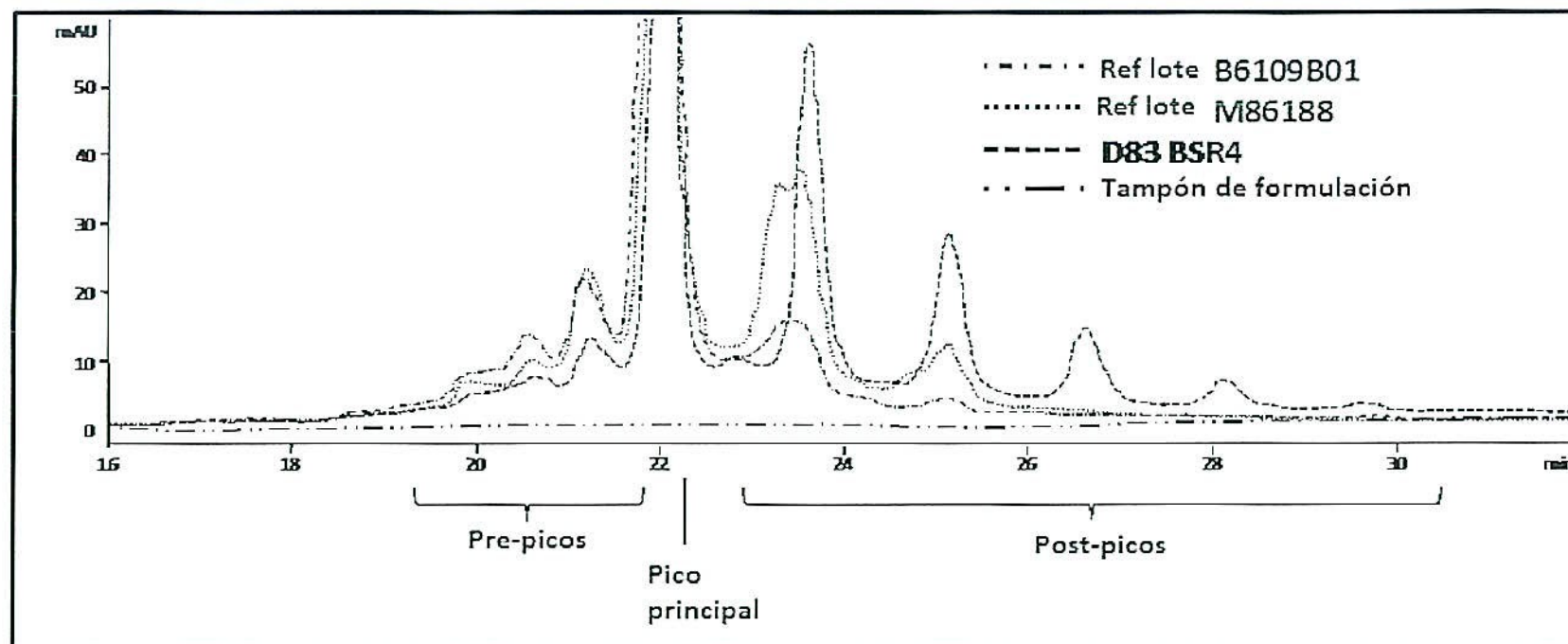


Figura 2



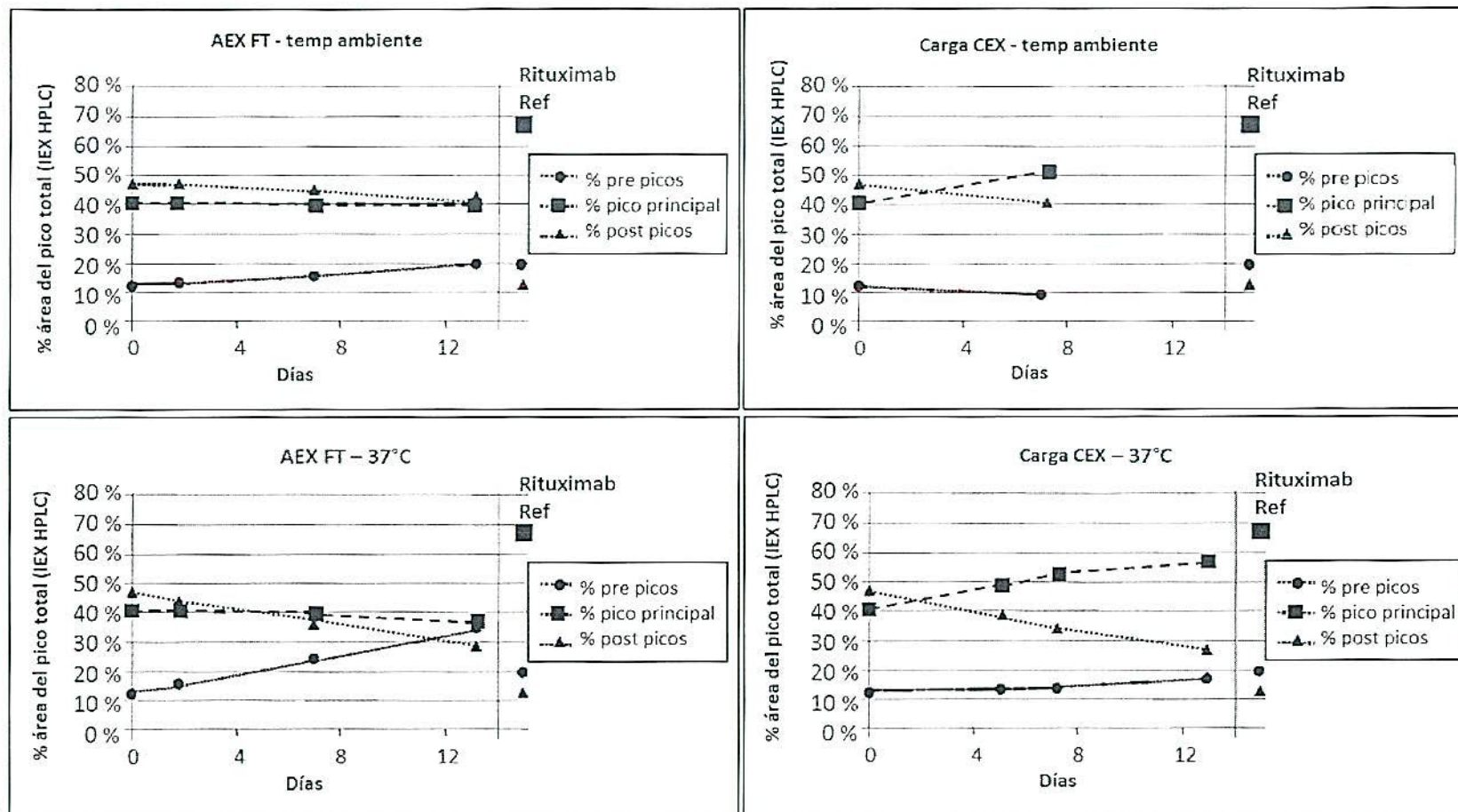


Figura 3

Figura 4

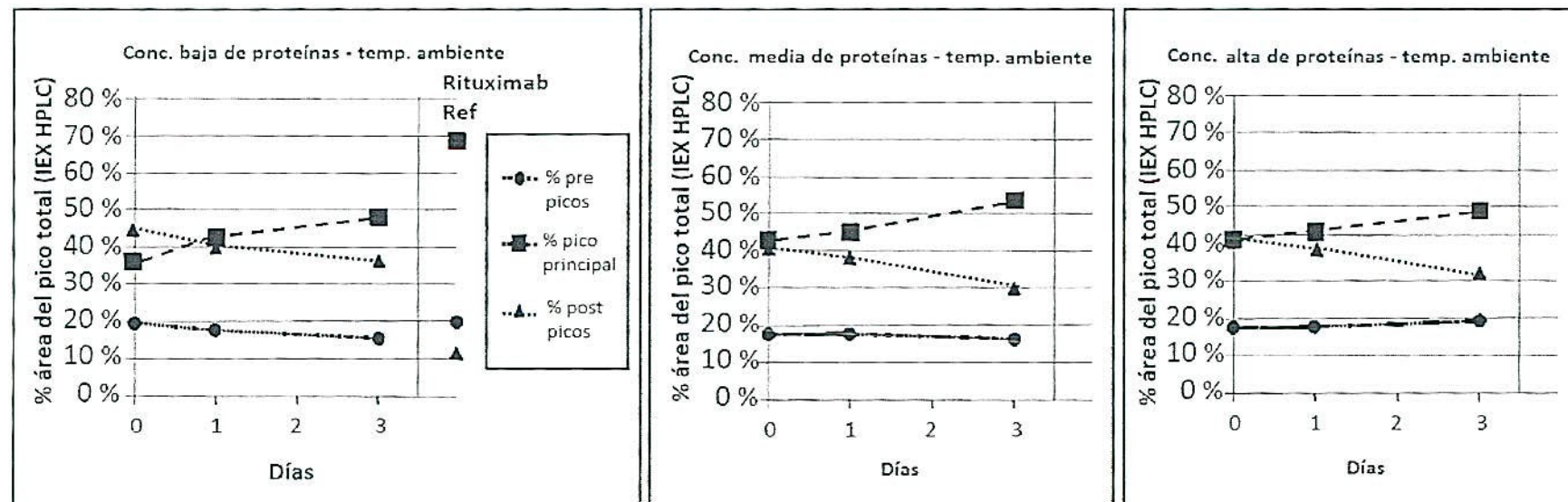


Figura 4 (cont.)

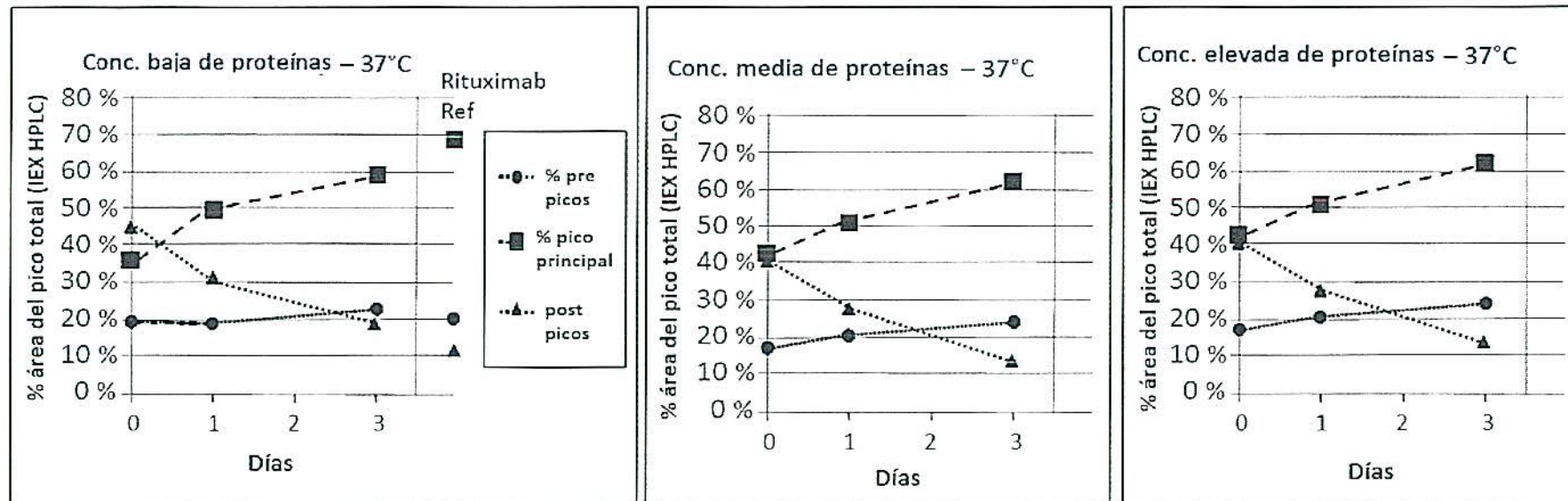
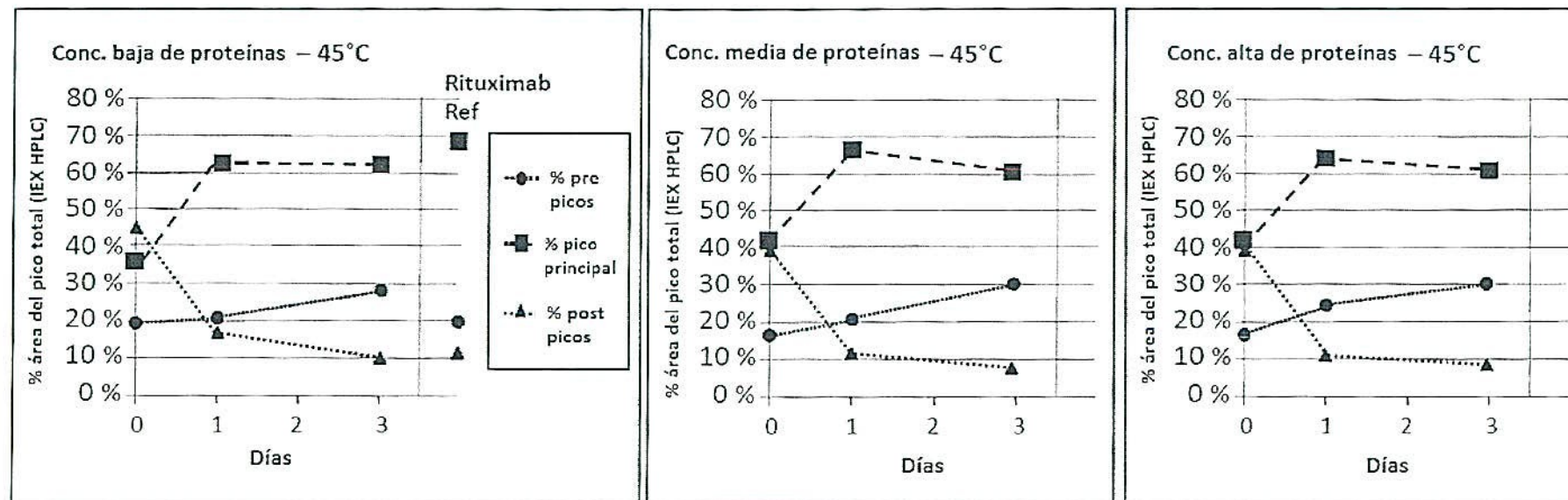


Figura 4 (cont.)



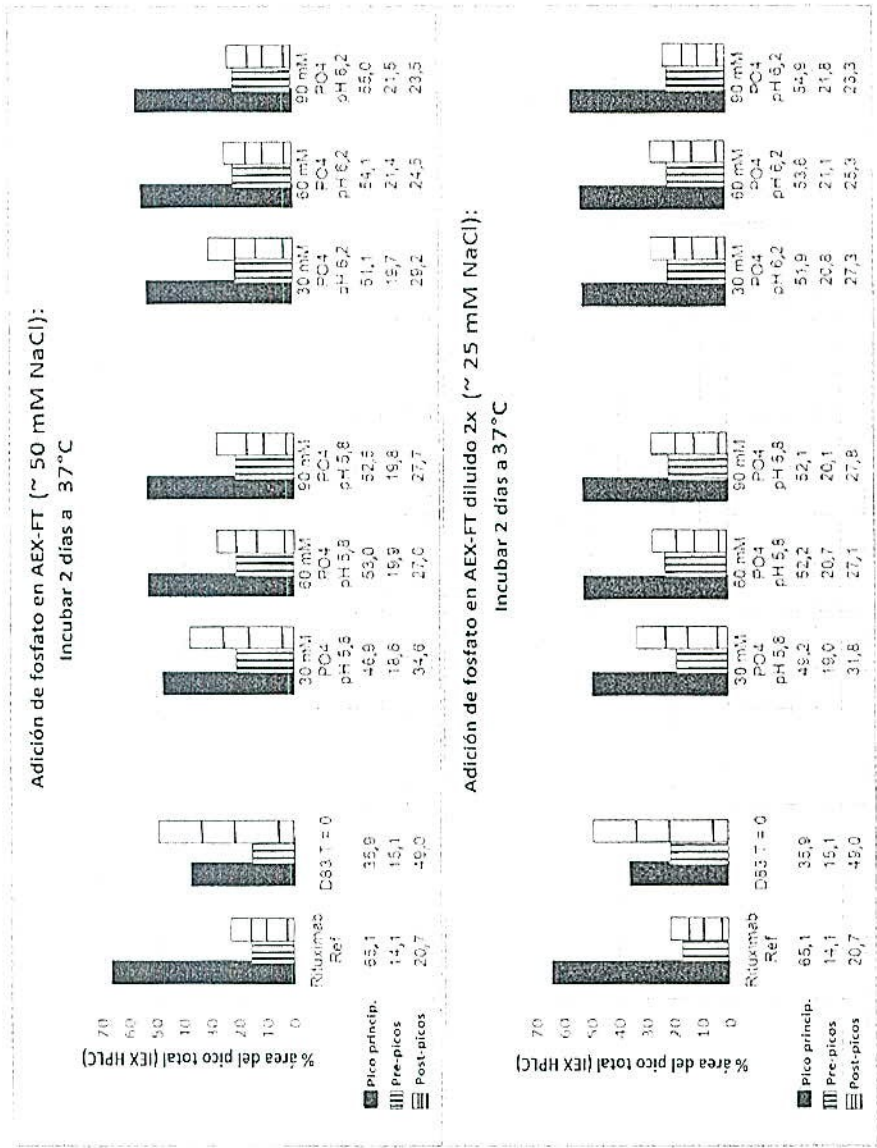


Figura 5

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2014/056700

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

ZBM PATENTS- ZEA, BARLOCCI &
MARKVARDSEN
Pl. Catalunya, 1
E-08002 Barcelona
ESPAGNE

Date of mailing (day/month/year) 11 December 2014 (11.12.2014)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P2661PC00	
International application No. PCT/EP2014/056700	International filing date (day/month/year) 03 April 2014 (03.04.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address MABXIENCE SA Via Maggio 1 CH-6900 Lugano Switzerland	State of Nationality CH	State of Residence CH
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The applicant indicated in here above box 1 have assigned their rights to the other applicant, who therefore remain the only applicant for the present international application.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☒ other: MABXIENCE SA

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Deprez Isabelle
Facsimile No. +41 22 338 89 75	e-mail pt05.pct@wipo.int
	Telephone No. +41 22 338 74 05

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2014/056700

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

ZBM PATENTS- ZEA, BARLOCCI &
MARKVARDSEN
Pl. Catalunya, 1
E-08002 Barcelona
ESPAGNE

Date of mailing (day/month/year) 11 December 2014 (11.12.2014)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P2661PC00	
International application No. PCT/EP2014/056700	International filing date (day/month/year) 03 April 2014 (03.04.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address MABXIENCE SWITZERLAND Via Maggio 1 CH-6900 Lugano Switzerland	State of Nationality CH	State of Residence CH
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address MABXIENCE SA Via Maggio 1 CH-6900 Lugano Switzerland	State of Nationality CH	State of Residence CH
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Deprez Isabelle e-mail pt05.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 05
---	---

13468152

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

52



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 101555

Bogotá D.C., Septiembre 16 de 2015 - 09:50:45

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	714477956	15/09/2015	29.829.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
5 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	160.000.00
			\$160.000.00

SON: **CIENTO SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-261580- -00000-0000

Fecha 2015-11-03 16:42:03 Dep 2020 DIR NULVASCOR
Tra 11 PATENTE Y II Eve 378 FASE NACIONAL I
Act 411 PRESENTACION Folios 54

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 16 de 2015 - 09:51:02

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

13468153

53



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 101486

Bogotá D.C., Septiembre 16 de 2015 - 09:50:45

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	714477956	15/09/2015	29.829.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	530.000.00	530.000.00
				\$530.000.00

SON: **QUINIENTOS TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-261580-00000-0000

Fecha 2015-11-03 16:42:03 Dep. 2020 DIR NULVASCH
Tra 11 PATENTE Y Lve 378 FASL NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios 54

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 16 de 2015 - 09:50:59



No. 15-261580- -00000-0000

Fecha: 2015-11-03 16:42:03 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTE IYI Ene: 378 FASE NACIONAL I
Act: 411 PRESENTACION Folios: 54

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILI ☐

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐