

MANUFACTURA DE PROTEÍNA

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un método para
5 manufacturar una proteína expresada en una célula hospedera;
en una manera más específica, la invención se refiere a un
método para manufacturar una proteína que resulta en una
proteína con niveles reducidos de impurezas relacionadas con
producto.

Antecedentes de la Invención

En el campo de terapéuticos, el uso de proteínas y
anticuerpos y moléculas derivadas de anticuerpo en
particular, ha estado constantemente ganando presencia e
importancia, y, consecuentemente, la necesidad de procesos de
15 manufacturación controlado se ha desarrollado en paralelo. La
comercialización de proteínas terapéuticas, requiere que sean
producidas en grandes cantidades. Para este propósito, la
proteína es frecuentemente expresada en una célula hospedera
y subsecuentemente ser recuperada y purificada, previo a su
20 preparación en una forma administrable.

Dependiendo de la proteína que será expresada, la
elección de la célula hospedera puede ser una célula
hospedera de mamífero, frecuentemente una célula CHO (ovario
de hámster Chino), o una célula hospedera bacteriana. En el
25 primer caso, la proteína es típicamente secretada en el

sobrenadante de cultivo el cual es recuperado, y la solución es entonces procesada para purificación de la proteína.

Cuando la célula hospedera es una célula procariótica Gramnegativa, un sistema de expresión a menudo preferido, involucra la proteína recientemente sintetizada que se acumula dentro de, y es aislada del espacio periplásmico. En este caso, una vez que se ha logrado el nivel deseado de expresión de la proteína, son las células que son recolectadas y procesadas. La proteína es entonces recuperada por medio de someter las células recolectadas a un proceso de extracción de proteína el cual involucra liberar la proteína del periplasma en solución y remoción subsecuente de desechos celulares y otras impurezas. Estas etapas de recolección de células a liberación de proteína son típicamente incluidas en lo que es llamado recuperación primaria. La solución que contiene proteína resultante es entonces procesada para purificación de proteína. Las células procarióticas Gramnegativas preferidas usadas para expresión periplásmica son en general, cepas de *Escherichia coli*, o células de *Pseudomonas fluorescens*.

La recuperación de la proteína heteróloga expresada en la célula hospedera procariótica durante la extracción primaria del espacio periplásmico ha sido a menudo un desafío. En este aspecto, diferentes métodos se han descrito en la técnica anterior. Por ejemplo, el documento US

5,655,866 describe el uso de tratamiento por calor para facilitar el aislamiento subsecuente de fragmentos Fab' funcionales de anticuerpos. El documento WO 2006/054063 describe la inclusión de un tratamiento sin lisis en combinación con tratamiento con calor en la etapa de extracción primaria. El documento WO 2005/019466 describe la inclusión de una etapa de interrupción después de la fermentación, pero previo a la extracción. El documento US 2013/0060009 describe el ajuste de pH de las muestras previo a someterse al tratamiento con calor durante la etapa de extracción.

Sin embargo, otro desafío significativo es el alto nivel de impurezas presentes después de la extracción primaria la cual incrementa la carga en las etapas de purificación subsecuentes y la eficiencia total del proceso de purificación completo. Estas impurezas pueden estar en la forma de desechos celulares, proteínas de células hospederas (HCP, por sus siglas en inglés), ADN, o impurezas relacionadas con el producto tal como formas truncadas del producto expresado, agregados u otras formas modificadas tales como formas desamidadas, isomerizadas, oxidadas u otras formas conjugadas. De estas, los productos de degradación de proteína recombinante, también llamados impurezas relacionadas con el producto, son a menudo las más difíciles de remover durante el proceso de extracción con calor y

recuperación primaria dado que tienen propiedades físico químicas muy similares, tales como temperatura de fusión (T_m , por sus siglas en inglés), a la proteína objetivo.

Aunque la solución de proteína resultante obtenida
5 después de la extracción entonces será procesada para purificación de proteína, el nivel de pureza de esta solución impacta la eficiencia y costos totales asociados con las etapas de purificación, y por lo tanto aquella de la producción de proteína terapéutica total. Este efecto llega a
10 ser aún más aparente cuando se considera la manufacturación de proteína a gran escala. En particular impurezas relacionadas con el producto que tienen un impacto en el perfil de calidad del producto final, el control del cual es particularmente relevante para consistencia a través de
15 diferentes lotes.

Como tal, permanece una necesidad en la técnica de métodos que mejoren la remoción de impureza durante la extracción de proteína a partir del cultivo celular.

Breve Descripción de las Figuras

20 Figura 1. Potencial rédox y perfiles de temperatura de extracciones. Como se puede observar, mantener una cubierta de nitrógeno durante la etapa de tratamiento con calor mantiene una medición de potencial rédox baja a través de esta, con un mínimo alrededor de -435 mV y típicamente -
25 375 mV durante la temperatura mantenida a 59°C. Se observó un

potencial rédox similarmente bajo cuando el nitrógeno se roció. Cuando el amortiguador que contiene células hospederas se cubrió con aire en lugar de nitrógeno, se puede ver que los valores de potencial rédox fueron significativamente superiores durante la extracción de la etapa de calor, llegando a ser positivos (típicamente alrededor de +45 mV) durante la temperatura mantenida a 59°C. Un potencial rédox altamente similar se observó cuando se roció el aire. El rociado gaseoso se intercambió para cubrir parcialmente a través de las extracciones debido a los altos niveles de espumación observados.

Figura 2. El gel de SDS-PAGE de muestras de post-extracción. El carril M representa los marcadores estándares de peso molecular (Mark 12, Invitrogen). El carril 1 es un estándar de referencia Fab' alfa anti-TNF. El carril 2 es un estándar DsbC (proteína isomerasa de unión de disulfuro). El carril 3 es una muestra post-extracción donde se aplicó una cubierta de nitrógeno durante la extracción. El carril 4 es una muestra post-extracción donde se aplicó una cubierta de aire durante la extracción. El carril 5 es una muestra post-extracción donde el nitrógeno se roció a través de la muestra durante la extracción. El carril 6 es una muestra post-extracción donde el aire se roció a través de la muestra durante la extracción. La figura muestra que, en la presencia de nitrógeno, las condiciones de reducción durante la

extracción con calor son suficientes para permitir la reducción significativa en el nivel de impurezas relacionadas con el producto, como se compara con las extracciones realizadas en la presencia de aire.

5 Figura 3. Fragmentos Fab' total expresados como % de todas las especies relacionadas con el producto como se mide por HPLC de CEX siguiendo la purificación de la Proteína L. Puede ser observado un claro efecto de tener una cubierta de nitrógeno en la separación de impurezas relacionadas con
10 el producto. La extracción #8, donde no se aplicó cubierta de nitrógeno, tiene niveles significativamente superiores de impurezas relacionadas con el producto. Por otro lado, la figura también sugiere que la velocidad de cubierta de nitrógeno podría tener un efecto en la separación de esta
15 impureza, comparando las extracciones 1 a 2, y 7 a 8.

 Figura 4. Fragmentos Fab' totales expresados como % de todas las especies relacionadas con el producto como se mide por HPLC de CEX después de la purificación de la Proteína L. Los resultados muestran nuevamente el beneficio
20 de la presencia de nitrógeno, resultando en niveles significativamente reducidos de impurezas relacionadas con el producto que permanecen después de la extracción de calor. Un efecto benéfico adicional se deriva del ajuste de pH realizado previo a la extracción de calor, ya que los niveles
25 de impurezas relacionadas con el producto parecen ser además

reducidos en comparación con los ejemplos previos.

Figura 5. Medición de potencial rédox de punto final contra volumen lleno de matraz sacudido. Estos resultados demuestran que los matraces sacudidos los cuales se prepararon en la presencia de una cubierta de nitrógeno, mantienen un ambiente más reducido en el extracto que los matraces los cuales se prepararon en la presencia de aire. La figura también muestra que los matraces con un volumen de llenado más grande fueron más reducidos que aquellos con un volumen de llenado más pequeño, debido a una velocidad de oxidación más lenta del extracto debido a la relación de área de superficie más pequeña a volumen. Los matraces preparados en aire todos tienen un valor de potencial rédox de punto final positivo, son correlación con el volumen lleno.

Figura 6. Fragmentos Fab' totales expresados como % de todas las especies relacionadas con el producto como se mide por HPLC de CEX después de la purificación de la Proteína L. Estos resultados muestran que los matraces sacudidos los cuales se prepararon bajo nitrógeno, tienen niveles significativamente inferiores de impurezas relacionadas con el producto post-extracción. Todos los matraces preparados con nitrógeno (intervalo potencial de rédox de punto final -10 mV a -1 16 mV) demuestran niveles de impureza relacionados con el producto significativamente inferiores que todos los matraces preparados en aire

(intervalo de potencial rédox de punto final +79 mV a +97 mV).

Figuras 7A-7B. Efecto de pH y ambiente reducido en la T_m de los fragmentos Fab' purificados. La figura muestra los resultados de la determinación de la estabilidad térmica para las dos especies principales de impurezas relacionadas con el producto. El potencial rédox y estabilidad térmica (temperatura de fusión), se muestran para correlacionarse; a inferior potencial rédox, inferior la temperatura de fusión de la proteína. Un efecto similar puede ser descrito para el pH cuando llega a ser más neutral. Ambas variables podrían hacer a las impurezas relacionadas con el producto más propensas a la degradación, por lo tanto, facilitando su separación.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención resuelve la necesidad identificada anteriormente proporcionando un método novedoso de manufactura de proteína en donde la proteína es expresada en una célula hospedera. En particular, la presente invención proporciona un método adecuado para manufactura industrial.

En una primera modalidad la invención proporciona un método para manufacturar una proteína de interés en donde tal proteína es expresada en una célula hospedera, que comprende

- cultivar tales células hospederas bajo

condiciones de manera que expresan tal proteína,

- recolectar las células hospederas a partir del fluido de cultivo celular,

- agregar amortiguador a las células hospederas,

5 and

- someter las células hospederas en amortiguador a tratamiento de calor en donde el potencial redox del amortiguador se mantiene por debajo de 0 mV durante tal tratamiento con calor.

10 En una modalidad particular, las células hospederas son células procarióticas, tales como bacteria gramnegativa. En otra modalidad, las células hospederas son células *E. coli* o células *P. fluorescens*. Las células hospederas procarióticas para la expresión de la proteína son bien

15 conocidas en la técnica (Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol 72, 211-222.). Las células hospederas de conformidad con la invención

20 incluyen células recombinantes las cuales han sido diseñadas por ingeniería genética para producir la proteína de interés tal como un fragmento de anticuerpo. Las células hospederas de *E. coli* recombinantes, pueden ser derivadas de cualquier cepa de *E. coli* adecuada que incluye a partir de MC4100, TG1,

25 TG2, DHB4, DH5a, DH1, BL21, K12, XU Blue y JM109. Un ejemplo

es la cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) una cepa hospedera comúnmente usada para fragmentaciones de la proteína recombinante. Los fragmentos de anticuerpo también pueden ser producidos cultivando cepas de *E. coli* modificadas, por ejemplo, mutantes metabólicos o cepas de *E. coli* deficientes de proteasa, tales como las descritas en los documentos WO 2011/086138, WO 2011/086139, WO 2011/086136 y WO 2013/007388, los cuales se incorporan en la presente en su totalidad.

Una proteína de interés que puede ser purificada de conformidad con los métodos de la presente invención es típicamente aislada a partir del periplasma de la célula hospedera de *E. coli*. Los métodos para dirigir proteínas a este compartimiento son bien conocidos en la técnica (Makrides, S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol Rev 60, 512-538.). Ejemplos de secuencias de señal adecuada para dirigir proteínas al periplasma de *E. coli* incluyen, secuencias señal PhoA, OmpA, OmpT, LamB y OmpF de *E. coli*.

La expresión de la proteína recombinante en las células hospederas de *E. coli* también puede estar bajo el control de un sistema inducible, de este modo la expresión del anticuerpo recombinante en *E. coli* está bajo el control de un promotor inducible. Muchos promotores inducibles adecuados para uso en *E. coli* son bien conocidos en la técnica y dependiendo de la expresión del promotor de la

proteína recombinante, pueden ser inducidos variando factores tales como la temperatura o la concentración de una sustancia particular en el medio de crecimiento. Ejemplos de promotores inducibles incluyen los promotores lac, tac, y trc de *E. coli*, los cuales son inducibles con lactosa o el análogo de lactosa no hidrolizable, isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y los promotores phoA, trp y araBAD, los cuales son inducidos por fosfato, triptofano y L-arabinosa, respectivamente. La expresión puede ser inducida mediante, por ejemplo, la adición de un inductor o un cambio en la temperatura donde la inducción es dependiente de la temperatura. Donde la inducción de la expresión de la proteína recombinante se logra por la adición de un inductor al cultivo, el inductor puede ser agregado por cualquier método adecuado dependiendo del sistema de fragmentación y el inductor, por ejemplo, por adiciones de tiro único o múltiple o por una adición gradual de inductor a través de una alimentación. Se apreciará que puede existir un retardo entre la adición del inductor y la inducción actual de la expresión de la proteína, por ejemplo, donde el inductor es lactosa, puede existir un retardo antes de que ocurra la inducción de la proteína mientras cualquier fuente de carbono pre-existente es utilizada antes de la lactosa.

Alternativamente, la proteína de interés que puede ser purificada de conformidad con los métodos de la presente

invención es aislada a partir de periplasmas de *P. fluorescens*. Las secuencias adecuadas que dirigen las proteínas al compartimiento periplásmico en *P. fluorescens* incluyen, líderes de secreción de tipo sec, como se han descrito en la técnica (D.M. Retallack, et al. Transport of heterologous proteins to the periplasmic space of *Pseudomonas fluorescens* using a variety of native signal sequences Biotechnol. Lett., 29 (2007), pp. 1483-1491). La expresión de la proteína de interés puede estar bajo el control de un sistema inducible, de este modo, la expresión está bajo el control de un promotor inducible como se describe en el párrafo precedente. Los inductores bien conocidos tales como IPTG, pueden ser usados en este contexto, alternativamente los inductores tales como benzoato de antranilato que inducen a los promotores Pben509 y Pben278, respectivamente, han sido descrito en los sistemas de expresión de *P. fluorescens*.

Los cultivos de células hospederas procarióticas (fermentaciones), pueden ser cultivados en cualquier medio que soportará el crecimiento de las células hospederas y expresión de la proteína recombinante. El medio puede ser cualquier medio químicamente definido, tal como por ejemplo, descrito por *E. coli* en Durany O, et al. (2004). Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *Escherichia coli*. Process Biochem 39, 1677-1684.

La fermentación de células hospederas procarióticas

puede ser realizada en cualquier sistema adecuado, por ejemplo, modo continuo, lote o alimentación de lote, dependiendo de la proteína y los rendimientos requeridos. El modo de lote puede ser usado con adiciones cortas de nutrientes o inductores donde se requiera. Alternativamente, un cultivo de alimentación de lote puede ser usado y los cultivos crecer en pre-inducción de modo de lote a la velocidad máxima de crecimiento específico que puede ser sostenida usando los nutrientes inicialmente presentes en el fermentador y uno o más regímenes de alimentación de nutriente usados para controlar la velocidad de crecimiento hasta que se completa la fermentación. El modo de alimentación de lote también puede ser usado en pre-inducción para controlar el metabolismo de las células hospederas procarióticas y permitir a las densidades celulares superiores ser alcanzadas.

Las células hospederas son entonces recolectadas del medio de fragmentación, por ejemplo, las células hospederas son recolectadas a partir de la muestra por centrifugación, filtración o por concentración.

En una modalidad del método de conformidad con la presente invención, la etapa de recolección celular comprende una etapa de centrifugación y recuperación celular. En una modalidad preferida particular de la invención, tal etapa de centrifugación es centrifugación continua, a partir de la

cual una suspensión celular es recuperada.

Para procesos de cultivo de células hospederas procarióticas (por ejemplo, *E. coli*), en donde la proteína de interés tal como un fragmento de anticuerpo se encuentra en el espacio periplásmico de la célula hospedera se requiere para liberar la proteína a partir de la célula hospedera. La liberación se puede lograr por cualquier método o combinación adecuada de métodos tales como lisis celular por tratamiento mecánico o presión, tratamiento de congelación-descongelación, choque osmótico, agentes de extracción, y/o tratamiento con calor. Tales métodos de extracción para liberación de proteína son bien conocidos en la técnica. En el método de la presente invención, la extracción de proteína se logra por un tratamiento con una etapa de calor, es decir, manteniendo la muestra a una temperatura elevada durante un periodo definido.

De conformidad con el método de la presente invención, se agrega amortiguador a las células recolectadas a partir del fluido de cultivo celular previo a la etapa de tratamiento con calor. En una modalidad particular del método de la invención, tal amortiguador es 100 mM de Tris y 10 mM de EDTA a pH 7.4, en una modalidad adicional, tal amortiguador de extracción es 75 mM de Tris y 7.5 mM de EDTA a pH 7.4, 200 mM de Tris y 20 mM de EDTA a pH 7.4, o 300 mM de Tris y 30 mM de EDTA a pH 7.4. En una modalidad de la

invención el amortiguador tiene un pH el cual asegura que el pH de la muestra es pH 6 a 9, por ejemplo, pH 6 a 8, previo a la etapa de tratamiento con calor como se describe en el documento WO 2012/013930 el cual se incorpora en la presente
5 en su totalidad. Preferiblemente, tal pH es 6.5 a 8, pH 6.8 a 7.8, o pH 7 a 7.6.

El experto en la técnica podría saber de amortiguadores adicionales adecuados descritos en la técnica, que serán usados para extracción de la proteína.

10 En una modalidad alternativa adicional, el potencial redox de tal amortiguador se mantiene por debajo de -100 mV, -200 mV, por debajo de -300 mV o por debajo de -400 mV.

El potencial redox del ambiente es particularmente
15 crítico para las dinámicas de los enlaces disulfuro entre los grupos tiol en los residuos de cisteína presentes en las moléculas de proteína. Cuando se reducen, tales enlaces disulfuro son interrumpidos alterando los grupos tiol correspondientes (-SH). Las moléculas de anticuerpo tienen
20 varios enlaces disulfuro, los cuales son críticos para mantener su estructura, y por lo tanto, su actividad biológica. Algunos de estos enlaces disulfuro son más accesibles que otros para reducir y/u oxidar especies presentes en el ambiente dada su posición dentro de la
25 molécula, y consecuentemente, más susceptibles a

interrupción.

En el contexto de la presente invención, las impurezas relacionadas con el producto son en efecto, fragmentos de la proteína de interés y por lo tanto, más pequeñas y más simples en estructura. Sin desear ser ligado por teoría, las uniones de cisteína dentro de tales impurezas relacionadas con el producto son más accesibles y por lo tanto, más susceptibles a interrupción como una consecuencia del potencial rédox del ambiente.

En una segunda modalidad del método de la invención, tal tratamiento con calor se realiza en un contenedor y tal potencial rédox se mantiene reduciendo la cantidad de oxígeno (O_2) presente en la fase gaseosa en el contenedor durante el tratamiento con calor.

En general existe un volumen de aire en el contenedor (referido en la presente como la fase gaseosa) arriba de la muestra compuesta de amortiguador y células hospederas. Dentro del significado de la presente invención, reducir la cantidad de oxígeno en la fase gaseosa, significa alterar la composición de tal fase gaseosa en una manera tal que contiene menos oxígeno que aire. Como se conoce en la técnica, el aire típicamente contiene aproximadamente 21 % de oxígeno (volumen).

Con el fin de mantener el potencial rédox por debajo de 0 mV de conformidad con el método de la invención,

un experto en la técnica podría estar consciente de diferentes medios disponibles para prevenir la oxidación de la muestra de extracción. Esto se puede lograr por remoción del oxígeno y otros gases presentes oxidantes en la fase gaseosa en el contenedor, típicamente por desplazamiento con otro gas inerte. Tal desplazamiento se puede lograr por medio de una cubierta de nitrógeno (N_2), es decir, manteniendo la muestra en el contenedor en contacto con un N_2 que contiene fase gaseosa, o rociando, es decir, burbujeando o pasando, el gas inerte a través de la muestra en el contenedor. Otros gases inertes que pueden ser usados para mantener un potencial redox de conformidad con el método de la invención incluyen argón y helio.

Alternativamente, existe una elección para reducir agentes disponibles en la técnica, que tienen grados variantes de resistencia. Consecuentemente, un experto en la técnica podría elegir el agente reductor más apropiado dependiendo del potencial redox deseado y el tiempo durante el cual debe ser mantenido. Los agentes reductores conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a glutathione, mercaptoetanol, ditiotreitól o Tris(2-carboxietil)fosfina.

El cultivo de células hospederas procarióticas puede tomar lugar en cualquier contenedor adecuado tal como un matraz sacudido o un fermentador dependiendo de la escala de producción requerida. Varios fermentadores a gran escala

están disponibles con una capacidad de más de 1,000 litros hasta aproximadamente 100,000 litros. Preferiblemente, fermentadores de 1,000 hasta 50,000 litros son usados, más preferiblemente, 1,000 hasta 25,000 o 1,000 hasta 20,000, 5 1,000 hasta 15,000, 1,000 hasta 10,000, 1,000 hasta 5,000, 20,000, 15,000, 12,000 10,000, 5000 o 2000 litros. Los fermentadores a escala más pequeña también pueden ser usados con una capacidad de entre 0.5 y 1,000 litros.

En una modalidad preferida, tal fase gaseosa 10 contiene menos de 20%, 15%, 12%, 10%, 8%, 5%, 2% o 1 % de oxígeno (volumen) durante la etapa de tratamiento con calor.

En una modalidad preferida, tal oxígeno es esencialmente excluido de la fase gaseosa durante la etapa de tratamiento con calor.

15 En una tercera modalidad del método de la invención, se agrega nitrógeno (N_2) a la fase gaseosa del contenedor.

En una cuarta modalidad del método de la invención, tal fase gaseosa contiene al menos 80% de N_2 , al menos 85%, 20 al menos 90% de N_2 , al menos 95% de N_2 o al menos 97% o 99% de N_2 . En una modalidad alternativa adicional, tal fase gaseosa es esencialmente N_2 .

Típicamente, tal N_2 se agrega a la fase gaseosa del contenedor como una cubierta y se mantiene en el espacio de 25 cabeza del contenedor que contiene el amortiguador y las

células hospederas agregando 100% de gas de N₂ al espacio de cabeza con desde 0.1 hasta 1 vvm (volumen de gas por volumen de líquido por minuto, es decir, 1 L/min para un volumen de extracción de 1 L).

5 En una modalidad particular la presente invención se refiere a un método para manufacturar una proteína de interés en donde tal proteína es expresada en una célula hospedera, que comprende

 - cultivar tales células hospederas bajo
10 condiciones de manera que expresan tal proteína,

 - recolectar las células hospederas a partir del fluido de cultivo celular,

 - agregar amortiguador a las células hospederas,
and

15 - someter las células hospederas en amortiguador a tratamiento de calor en un contenedor en donde la fase gaseosa del contenedor es esencialmente N₂.

 Dependiendo de la configuración del contenedor, tal N₂ puede ser agregado a la fase gaseosa del contenedor, en
20 donde el contenedor es subsecuentemente sellado, es decir, aislar el interior del contenedor del exterior, dejando el N₂ en la fase gaseosa durante el tratamiento con calor. Alternativamente, un flujo constante de N₂ se aplica a través de la fase gaseosa del contenedor durante la etapa de
25 tratamiento con calor, por ejemplo, para contenedores que no

permiten la posibilidad de sellar el interior del ambiente exterior.

En una modalidad el N_2 se agrega a, o introduce en la fase gaseosa antes de la etapa de tratamiento con calor
5 para asegurar que el potencial rédox se mantenga por debajo del valor deseado durante la etapa de tratamiento con calor.

En una modalidad particular, el método de la invención comprende:

- cultivar tales células hospederas bajo
10 condiciones de manera que expresen la proteína de interés,
- recolectar las células hospederas a partir del fluido de cultivo celular,
- agregar amortiguador a las células hospederas en un contenedor,
- 15 - agregar N_2 a la fase gaseosa del contenedor,
- sellar tal contenedor; y
- someter las células hospederas en amortiguador a tratamiento de calor en el contenedor en donde el potencial rédox de tal amortiguador se mantiene por debajo de 0 mV
20 durante tal tratamiento con calor.

Por lo tanto, en una modalidad adicional, del método de la invención, tal N_2 se introduce como una cubierta usando al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 99% o 100% de N_2 .

25 En una modalidad alternativa de la invención, tal

N₂ se introduce rociando N₂ a través del amortiguador durante el tratamiento con calor, preferiblemente, rociando N₂ esencialmente puro.

En una quinta modalidad de la invención, tal N₂ se
5 agrega al contenedor como una cubierta en la fase gaseosa del contenedor o rociando el N₂ a través del amortiguador.

El método de conformidad con la invención comprende una etapa de tratamiento con calor que hace posible obtener una muestra de proteína soluble, correctamente plegada y
10 ensamblada tal como un fragmento de anticuerpo facilitando la remoción de otro material relacionado con la proteína.

La proteína la cual es "correctamente plegada y ensamblada", se muestra por la presencia de una banda única que corresponde al peso molecular esperado para la cadena de
15 proteína ensamblada en SDS-PAGE sin reducción. Otro material relacionado con la proteína típicamente será fragmentos parcialmente degradados de proteína correctamente plegada y ensamblada.

La etapa de tratamiento con calor en el método de
20 la presente invención es una etapa de mantenimiento de la temperatura de la muestra a una temperatura elevada deseada una vez que esta temperatura elevada deseada se ha alcanzado durante una fase de calentamiento.

La etapa de tratamiento con calor se realiza
25 sometiendo la muestra a una temperatura elevada deseada. Muy

preferiblemente, la etapa de tratamiento con calor se realiza dentro del intervalo de 30°C hasta 70°C. La temperatura puede ser seleccionada como se desee y puede depender de la estabilidad de la proteína para purificación. En otra
5 modalidad, la temperatura está dentro del intervalo 40°C hasta 65°C, o preferiblemente, dentro del intervalo 40°C hasta 60°C, más preferiblemente, dentro del intervalo 45°C hasta 60°C, aún más preferiblemente, dentro del intervalo 50°C hasta 60°C y muy preferiblemente, a 55°C hasta 60°C,
10 58°C hasta 60°C o 59°C. De este modo, las temperaturas mínimas son 30°C, 35°C o 40°C y las temperaturas máximas 60°C, 65°C o 70°C.

En una sexta modalidad del método de la invención, tal la etapa de tratamiento con calor se realiza a 30°C hasta
15 70°C.

En una séptima modalidad del método de la invención, tal la etapa de tratamiento con calor se realiza a 55°C hasta 65°C.

La etapa de tratamiento con calor es
20 preferiblemente, llevada a cabo por un periodo de tiempo prolongado. La duración del tratamiento con calor es preferiblemente, entre 1 y 24 horas, o entre 1 y 18 horas, más preferiblemente, entre 4 y 18 horas, aún más preferiblemente, entre 6 y 16 horas, y muy preferiblemente,
25 entre 8 y 14 horas o entre 8 y 12 horas, por ejemplo, 10

horas. De este modo, el tiempo mínimo para el tratamiento con calor es 1, 2 o 3 horas y el máximo es 20, 22 o 24 horas.

En una octava modalidad del método de la invención, la etapa de tratamiento con calor de la sexta o séptima
5 modalidad se mantiene por 1 hora hasta 18 horas.

Como un experto en la técnica sabe, existe en general, una relación inversamente proporcional entre los tiempos de reacción y las temperaturas, de este modo, a superior temperatura en la cual se realiza una reacción, más
10 corto el tiempo necesario para que la reacción tome lugar.

En una modalidad particular, el tratamiento con calor se realiza a 50°C hasta 60°C por 10 hasta 16 horas, y más preferiblemente, a 59°C por 10 hasta 12 horas. Un experto en la técnica entenderá que las temperaturas y tiempo pueden
15 ser seleccionadas como convenga a la muestra en cuestión y las características de la proteína de interés tales como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

En una modalidad alternativa adicional, del método de la invención, tal extracción de proteína se realiza a una
20 temperatura desde 58°C hasta 60°C por un periodo de 8 hasta 12 horas.

La etapa de tratamiento con calor es preferiblemente, llevada a cabo con agitación de la muestra tal como en un sacudidor o agitador ajustado para operar a
25 una velocidad de agitación adecuada, tal como 200

revoluciones por minuto (RPM). Sin embargo, la velocidad de agitación adecuada variará dependiendo de la escala del método.

En una novena modalidad del método de la invención, la muestra tiene o se ajusta a un pH de 6 a 9 antes de la etapa de tratamiento con calor. En una modalidad particular adicional del método de la invención, el pH de tal muestra es 6.5 hasta 8, 6.5 hasta 7.5, o 6.8 hasta 7.2 antes de la etapa de tratamiento con calor.

En una modalidad particular, el pH de la muestra se mide o ajusta antes de la etapa de tratamiento con calor, para asegurar que el pH de la muestra durante la etapa de tratamiento con calor sea 5 a 9, preferiblemente, el pH de la muestra durante la etapa de tratamiento con calor es 6 hasta 7.

En una modalidad adicional, el pH se ajusta con una base tal como una base inorgánica por ejemplo, hidróxido de sodio o una base orgánica tal como trietilamina o trimetilamina o base tris.

Cualquier agente adecuado puede ser usado para ajustar el pH de la muestra. El agente puede ser el amortiguador o puede ser agregado antes y/o después del amortiguador. Los agentes típicos los cuales pueden ser usados para ajustar el pH comprenden o consisten de uno o más de los siguientes: NaOH, NH_4OH , ácido sulfúrico, EDTA, Tris

amortiguador.

En una modalidad particular adicional, el pH de la muestra se mide o ajusta antes de la etapa de tratamiento con calor y antes de la adición de un gas inerte tal como nitrógeno a la fase gaseosa del contenedor con el fin de mantener el potencial rédox por debajo de 0 mV. Alternativamente, en otra modalidad de la invención, el pH de la muestra es medido y/o ajustado antes de la etapa de tratamiento con calor y el gas inerte tal como nitrógeno se pasa a través de la muestra durante la etapa de tratamiento con calor.

Las mediciones de pH referidas en la presente son en general normalizadas a 20°C.

En el contexto de la presente invención "antes de la etapa de tratamiento con calor" significa previo a, y que incluye el punto en tiempo en el cual la muestra comienza a alcanzar la temperatura elevada deseada y la etapa de tratamiento con calor (retención a una temperatura elevada). Con el fin de alcanzar la temperatura elevada deseada para la etapa de tratamiento con calor, la muestra es sometida a una "fase de calentamiento" durante la cual la temperatura de la muestra es elevada a la temperatura deseada. En una modalidad, el método de conformidad con la invención comprende someter la muestra a una fase de calentamiento y una etapa de tratamiento con calor. En la modalidad en donde

el método comprende someter la muestra a una fase de calentamiento y una etapa de tratamiento con calor, la muestra puede estar al nivel de pH requerido previo al inicio de la fase de calentamiento y/o al nivel de pH requerido
5 durante la fase de calentamiento.

En una modalidad particular, se agrega N_2 a la fase gaseosa del contenedor previo al inicio de la fase de calentamiento. Preferiblemente, la muestra está al nivel de pH requerido previo a tal fase de calentamiento.

10 En una décima modalidad del método de la invención, la proteína de interés es una proteína recombinante codificada en un vector de expresión.

En una décima primera modalidad, en el método de conformidad con la octava modalidad de la invención, la
15 proteína es un anticuerpo recombinante.

En una décima segunda modalidad tal anticuerpo recombinante es un fragmento de anticuerpo recombinante.

Existen muchos fragmentos de anticuerpo recombinante conocidos en la técnica que incluyen fragmentos
20 Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv y scFv. Alternativamente el anticuerpo recombinante se selecciona a partir de anticuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos de cadena única, anticuerpos biespecíficos, triespecíficos, tetraespecíficos o
25 multiespecíficos, formados de fragmentos de anticuerpo o

anticuerpos, que incluyen, pero no se limitan a constructos de Fab-Fv.

En una treceava modalidad del método de la invención, tal anticuerpo recombinante o fragmento de anticuerpo recombinante se une específicamente a TNF-alfa o a CD154.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para la manufactura de un anticuerpo recombinante en donde tal anticuerpo recombinante es expresado en una célula hospedera, que comprende cultivar tales células hospederas bajo condiciones de manera que expresan tal proteína, recolectar las células hospederas a partir del fluido de cultivo celular, agregar amortiguador a las células hospederas, y someter las células hospederas a tratamiento con calor para extraer el anticuerpo recombinante a partir de tales células hospederas en un contenedor en donde el potencial redox de tal amortiguador se mantiene por debajo de 0 mV, por debajo de -100 mV, por debajo de -200 mV, por debajo de -300 mV o por debajo de -400 mV, durante tal extracción.

En otra modalidad particular, la presente invención proporciona un método para la manufactura de un anticuerpo recombinante en donde tal anticuerpo recombinante es expresado en una célula hospedera, que comprende cultivar tales células hospederas bajo condiciones de manera que

expresan tal proteína, recolectar las células hospederas a partir del fluido de cultivo celular, agregar amortiguador a las células hospederas en un contenedor, agregar N₂ a la fase gaseosa del contenedor, someter las células hospederas a
5 tratamiento con calor, y recuperar tal proteína.

En otra modalidad particular el método de la invención, proporciona un método para la manufactura de un anticuerpo recombinante en donde tal anticuerpo recombinante es expresado en una célula hospedera, que comprende cultivar
10 tales células hospederas bajo condiciones de manera que expresan tal proteína, recolectar las células hospederas a partir del fluido de cultivo celular, agregar amortiguador a las células hospederas en un contenedor, agregar N₂ a la fase gaseosa del contenedor, someter las células hospederas a
15 tratamiento con calor, y recuperar tal proteína; en donde tal proteína recuperada tiene un nivel inferior de impurezas relacionadas con el producto comparado con la proteína recuperada a partir de un método de manufactura que comprende un tratamiento con calor realizado sin la presencia de N₂ en
20 la fase gaseosa del contenedor.

El método de conformidad con la presente invención puede comprender una o más etapas adicionales, tales como procedimientos de purificación tales como filtración y/o centrifugación. También incluida está la cromatografía de
25 lecho fluidizado. Los procedimientos de purificación

adicional preferidos incluyen, cromatografía de intercambio iónico, microfiltración, ultrafiltración, diafiltración, y captura de lecho fijo y captura de lecho expandido y combinaciones de cualquiera de estos.

5 El término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se usa en la presente, se refiere a anticuerpos monoclonales o policlonales. El término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se usa en la presente, incluye pero no se limita a anticuerpos recombinante que son generados por tecnologías recombinantes
10 como se conoce en la técnica. "Anticuerpo" o "anticuerpos" incluyen anticuerpos de cualquier especie, en particular de especies de mamífero; tales como anticuerpos humanos de cualquier isotipo, que incluyen IgA₁, IgA₂, IgD, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgG₄, IgE e IgM y variantes modificadas de los
15 mismos, anticuerpos de primate no humano, por ejemplo, de chimpancé, babuino, resus, o mono cinomólogo; anticuerpos de roedores, por ejemplo, de ratón, rata o conejo; anticuerpos de cabra o caballo; y anticuerpos de camélidos (por ejemplo, de camélidos o llamas tales como Nanobodies™) y derivados de
20 los mismos; o de especies de aves tales como anticuerpos de pollo o de especies de peces tales como anticuerpos de tiburón. El término "anticuerpo" o "anticuerpos", también se refiere a anticuerpos "quiméricos" en los cuales, una primera porción de al menos una secuencia de anticuerpo de cadena
25 ligera y/o cadena pesada es de una primera especie y una

segunda porción de la secuencia de anticuerpo de cadena ligera y/o pesada es de una segunda especie. Los anticuerpos quiméricos de interés de la presente incluyen, anticuerpos "primatizados" que comprenden especies de unión al antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del Viejo Mundo, tal como babuino, resus o mono cinomólogo) y secuencias de región constante humana. Los anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia derivada de anticuerpos no humanos.

Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos (anticuerpo recipiente) en el cual, los residuos de una región hipervariable del recipiente son reemplazados por residuos a partir de una región variable [o región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés)] de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo, pollo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y actividad deseada. En la mayoría de los casos los residuos del anticuerpo humano (recipiente) fuera de la CDR, es decir, en la región de armazón (FR), son adicionalmente reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo del recipiente o en el anticuerpo del donador. Estas modificaciones se hacen para refinar además el desempeño del anticuerpo. La humanización reduce la

inmunogenicidad de anticuerpos no humanos en humanos, de este modo facilitando la aplicación de anticuerpos al tratamiento de la enfermedad humana. Los anticuerpos humanizados y varias tecnologías diferentes para generarlos son bien conocidos en la técnica. El término "anticuerpo" o "anticuerpos", también se refiere a anticuerpos humanos, los cuales pueden ser generados como una alternativa a la humanización. Por ejemplo, es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de anticuerpos murinos endógenos. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes de línea germinal y quiméricos, resulta en la completa inhibición de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia del arreglo del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en tal ratón mutante de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos con especificidad contra un antígeno particular después de la inmunización del animal transgénico que lleva los genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana con tal antígeno. Las tecnologías para producir tales animales transgénicos, y las tecnologías para aislar y producir los anticuerpos humanos a partir de tales animales transgénicos se conocen en

la técnica. Alternativamente, en el animal transgénico; por ejemplo, ratón, solamente los genes de inmunoglobulina que codifican para las regiones variables del anticuerpo de ratón son reemplazados con secuencias de gen de inmunoglobulina variable humana correspondientes. Los genes de inmunoglobulina de línea germinal de ratón que codifican para las regiones constantes de anticuerpo permanecen sin cambio. En esta forma, las funciones efectoras del anticuerpo en el sistema inmune del ratón transgénico y subsecuentemente el desarrollo de las células B, está esencialmente sin cambio, lo cual puede conducir a una respuesta de anticuerpo mejorada después de la estimulación antigénica *in vivo*. Una vez que los genes que codifican para un anticuerpo particular de interés han sido aislados a partir de tales animales transgénicos, los genes que codifican para las regiones constantes pueden ser reemplazados con los genes de la región constante humana con el fin de obtener un anticuerpo completamente humano. Otros métodos para obtener anticuerpos/fragmentos de anticuerpo humanos *in vitro*, se basan en el despliegue de tecnología, tal como tecnología de despliegue de ribosoma o despliegue de fago, en donde las bibliotecas de AND recombinante son usadas, que son ya sea generadas al menos en parte artificialmente o a partir de repertorios de gen de dominio variable de inmunoglobulina (V) de donadores. Las tecnologías de despliegue de ribosoma y

fago para generar anticuerpos humanos son bien conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos también pueden ser generados a partir de células B humanas aisladas que son inmunizadas *ex vivo* con un antígeno de interés y subsecuentemente fusionadas para generar hibridomas los cuales entonces pueden ser seleccionados para el anticuerpo humano óptimo. El término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se usa en la presente, también se refiere a un anticuerpo aglicosilado.

En ciertas modalidades de esta invención, los anticuerpos son anticuerpos que son modificados por unión covalente de porciones funcionales tales como polímeros solubles en agua, tales como poli(etilenglicol), copolímeros de poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol), carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona) o poli(prolina) - todos los cuales se conocen por presentar vidas útiles sustancialmente más grandes en la sangre después de la inyección intravenosa que las proteínas no modificadas correspondientes.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos unidos a porciones funcionales tales como porciones de poli(etilenglicol) (PEG). En una modalidad particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden estar unidas a través de cualquier grupo funcional de aminoácido terminal o

cadena lateral de aminoácido disponible localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino libre, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo. Tales aminoácidos pueden ocurrir de manera natural en el fragmento de anticuerpo o pueden ser diseñados por ingeniería en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo, documentos US 5,219,996; US 5,667,425; WO 98/25971).

El término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se usa en la presente, no solamente se refiere a anticuerpos no truncados de cualquier especie, que incluyen de especies humanas (por ejemplo, IgG) y otros mamíferos, sino también se refiere a un fragmento de anticuerpo. Un fragmento de un anticuerpo comprende al menos un dominio de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada como se conoce en la técnica y se une a uno o más antígeno(s). Ejemplos de fragmentos de anticuerpo de conformidad con la invención incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv y scFv; así como también diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, anticuerpos de dominio (dAbs), tales como sdAbs, fragmentos V_HH y V_{NAR}, anticuerpos de cadena única, anticuerpos biespecíficos, triespecíficos, tetraespecíficos o multiespecíficos, formados de fragmentos de anticuerpo o anticuerpos, que incluyen pero no se limitan a constructos de Fab-Fv o Fab-Fv-Fv. Los fragmentos de anticuerpo como se define anteriormente, se conocen en la técnica.

El término "potencial rédox" como se usa en la presente, se refiere a la medición de la tendencia de una especie química para adquirir electrones y de este modo ser reducida. El potencial rédox es medido en volts (V), o milivolts (mV). Cada una de las especies tiene su propio potencial de reducción intrínseco; a más positivo el potencial, mayor la afinidad de las especies para los electrones y la tendencia a ser reducidos.

El término "extracción" o "extracción de proteína" como se usa en la presente, se refiere a remover la proteína expresada dentro de una célula hospedera a partir de la célula hospedera. La extracción puede involucrar la interrupción de la célula hospedera y el aislamiento de fluido intracelular a partir de los desechos celulares, o la manipulación de la célula hospedera para hacer la membrana celular externa de la bacteria gramnegativa u otras células que tienen una fuga de la membrana celular externa con el fin de liberar el fluido del espacio periplásmico a partir de tales células.

EJEMPLOS

Métodos

Proceso de fermentación A

W3110 de *E. coli* transfectado con un vector para así expresar un Fab' que se une específicamente a TNF-alfa humano, se usaron como las células hospederas.

Un vial de banco de células congeladas que contiene estas células se usó para inocular un matraz sacudido (700 ml de volumen total) que contiene medio de extracto de peptona-levadura 6x (6xP-Y) más tetraciclina. Este matraz sacudido se incubó a 30°C y 230 rpm. Al intervalo OD requerido (OD600 = 2-3), el matraz requerido se usó para inocular un fermentador de semillas (10 L de volumen total) que contiene Medio químicamente definido SM6 (Popplewell et al. Expression of Antibody Fragments by Periplasmic Secretion in Escherichia coli; Methods in Molecular Biology, vol. 308: Therapeutic Proteins: Methods and Protocols; 2005) más tetraciclina, con glicerol como la fuente de carbono. El cultivo celular dentro del fermentador de semillas se mantiene a 30°C, la concentración de oxígeno disuelto (pO_2) se mantiene a 30% y pH se controla a 7.0.

Al intervalo OD requerido (OD600 = 30-37), el cultivo celular se usó para inocular el fermentador de producción (600 L de volumen total) que contiene medio químicamente definido con glicerol como la fuente de carbono. El fermentador de producción se mantiene inicialmente a 30°C, 30% de pO_2 , y el pH se controla a 7.0, y las células crecen en fase de lote hasta la inducción. Durante la fase de lote, la temperatura se redujo a 25°C y se hizo una adición de $MgSO_4$ para evitar el agotamiento de este metabolito.

A un intervalo OD específico (OD600 = 43-47),

durante el cual ocurre el agotamiento de glicerol, se hizo una adición de bolo de la solución de lactosa al cultivo. La lactosa podría entonces ser utilizada por las células como la fuente de carbono y podría también actuar como un inductor de la expresión de Fab'. La concentración de lactosa se mantuvo a través de la fase de inducción mediante una alimentación continua y las células se recolectaron 30 horas posterior a la inducción.

Proceso de fermentación B

Un vial de banco de células congeladas que contiene Fab' de células hospederas MXE012 de *E. coli* que expresan un Fab' que se une específicamente a TNF-alfa humano, se usó para inocular un matraz sacudido (700 ml de volumen total) que contiene medio de extracto de peptona-levadura 6x (6xP-Y) más tetraciclina. Este matraz sacudido se incubó a 30°C y 230 rpm. Al intervalo OD requerido (OD600 = 2-3), el matraz requerido se usó para inocular un fermentador de semillas (10 L de volumen total) que contiene MD medio químicamente definido (Durany et al. 2004. Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *Escherichia coli*. Process Biochem 39:1677-1684) más tetraciclina, con glicerol como la fuente de carbono. El cultivo celular dentro del fermentador de semillas se mantiene a 30°C, la concentración de oxígeno disuelto (pO₂) se mantiene a 30% y pH se controla a 6.9.

Al intervalo OD requerido ($OD_{600} = 30-37$), el cultivo celular se usó para inocular el fermentador de producción (600 L de volumen total) que contiene medio químicamente definido con glicerol como la fuente de carbono.

5 El fermentador de producción de mantiene inicialmente a 30°C , 30% pO_2 , con pH controlado a pH 6.9 y que crece en fase de lote hasta que el glicerol se agotó. Durante este tiempo, se hizo una adición de $MgSO_4$ para evitar el agotamiento de este metabolito.

10 Al final de la fase de lote, se cambió una alimentación de glicerol exponencial y el cultivo se alimentó a una cantidad específica de glicerol para lograr un OD_{600} de aproximadamente 70 unidades. En este punto, la alimentación del glicerol se cambió de una alimentación exponencial a una
15 alimentación lineal y la expresión de Fab' se indujo por la adición de IPTG (38.79 g/kg de cultivo). Las células se recolectaron 40 horas post-inducción.

La cepa de *E. coli* MXE012 es una *E. coli* mutante metabólica que contiene la mutación sprH145A en el gen spr
20 como se describe en el documento WO 2011/086136 (incorporado en la presente en su totalidad).

Métodos de Recuperación y Extracción

Se recolectaron células por centrifugación continua usando una centrífuga de pila de disco Westfalia PSC 5.

25 La suspensión celular concentrada se resuspendió

nuevamente a la concentración de recolección de célula original en recipientes de vidrio de 2L o 5 L por la adición de agua y extracción de amortiguador a pH 7.4 a una concentración de amortiguador de extracción final de 10 mM de EDTA, 100 mM de Tris.

Donde se requiere, las células resuspendidas se ajustaron a pH 7.2 por la adición de 2.5 M de base Tris al amortiguador de extracción, antes de la extracción de la proteína mediante una etapa de calentamiento. Para la extracción de calor, las células se calentaron a 59 °C por 10 horas. La temperatura y mezclado se mantuvieron usando unidades de control Biostat BPIus (Sartorius) y software de Sistema de Control de Fermentador Múltiple (MFCS®).

Purificación de muestra

Especies relacionadas a Fab' se purificaron a partir de las muestras de extracción para permitir la evaluación de impurezas relacionadas con el producto. Las muestras de extracción se clarificaron primero por centrifugación, recolección del sobrenadante clarificado y filtración a través de un filtro de 0.2 µm. El sobrenadante clarificado entonces se cargó en columnas de 1 mL de Proteína L (Pierce #89928), se lavó con una baja concentración de amortiguador de fosfato a pH 7.4 y se eluyó con un amortiguador de glicina a pH 2.8. Se demostró que la resina de la Proteína L podría capturar fragmentos Fab' y que la

recuperación fue lineal y reproducible dentro del intervalo experimental.

Análisis de muestra

Las muestras purificadas se analizaron y
5 cuantificaron por cromatografía de Intercambio Catiónico.
Las muestras se cargaron sobre una columna analítica
Dionex Pro Pac SCX-10 (Thermo Scientific) y se eluyeron
usando un gradiente de sal. Las proteínas eluidas se
monitorearon a 280 nm y los picos del cromatograma se
10 cuantificaron e interpretaron de conformidad con un
procedimiento estándar.

Ejemplo 1

Se llevó a cabo la fermentación de conformidad
con el proceso B y la proteína se extrajo como se
15 describe anteriormente. El potencial rédox se midió
durante el proceso de extracción en los contenedores
usando sondas ORP (Potencial de Oxidación-Reducción)
(Broadley James Corporation, Irvine CA) y se monitoreó
usando MFCS® software (Sartorius, Bethlehem PA).

20 Con el fin de evaluar el efecto de mantener un
ambiente rédox reducido, algunos contenedores de
extracción fueron expuestos a nitrógeno y otros fueron
expuestos al aire durante la extracción, también el gas
fue ya sea rociado a través de la muestra en los
25 contenedores, o mantenido como un flujo de cubierta al

espacio de cabeza de los contenedores.

La Tabla 1 abajo, muestra un sumario de las condiciones de flujo de gas del contenedor. Todos los flujos de gas se mantuvieron a una velocidad de flujo de 1 vvm (volumen de gas por volumen de líquido por minuto, es decir, 1 L/min para una extracción de 1L) usando 100% de Nitrógeno o suministro de aire comprimido.

Tabla 1.

10

# de Extracción	Condición
1	Cubierta de N ₂
2	Cubierta de Aire
3	N ₂ Rociado
4	Aire Rociado

Las Figuras 1 y 2 muestran los perfiles de temperatura y rédox correspondiente de las extracciones (figura 1) y un gel SDS-PAGE de muestras de post-extracción (figura 2).

Como se puede derivar a partir de estas figuras, mantener una cubierta de nitrógeno durante la etapa de tratamiento con calor mantiene una medición de potencial rédox baja completa, con un mínimo alrededor de -435 mV y típicamente -375 mV durante la retención de temperatura a 59°C. Un potencial rédox similarmente bajo se observó cuando el nitrógeno se roció. Cuando el amortiguador que contiene células hospederas se cubrió con aire en lugar

de nitrógeno, se puede ver que los valores de potencial fueron significativamente superiores durante la extracción de la etapa de calor, llegando a ser positivo (típicamente aproximadamente +45 mV) durante la retención de temperatura a 59°C. Un potencial rédox similarmente alto se observó cuando se roció aire. El rociado gaseoso se cambió a una cubierta parcial a través de las extracciones debido a los altos niveles de espumación observados.

La Figura 2 demuestra una diferencia significativa en el nivel de impureza relacionada con el producto como se mide por SDS-PAGE. La Figura muestra que en la presencia de nitrógeno, las condiciones de reducción durante la extracción de calor son suficientes para permitir la reducción significativa en el nivel de impurezas relacionadas con el producto comparado con las extracciones realizadas en la presencia de aire.

Ejemplo 2

La fermentación de conformidad con el proceso A y extracción subsecuente se realizaron como se describe anteriormente. Una velocidad de flujo de nitrógeno al espacio de cabeza se varió desde 0.1 vvm hasta 1 vvm en combinación con agitación y volúmenes de llenado variados de conformidad con la Tabla 2.

Tabla 2

Número de Extracción	Cubierta de nitrógeno (vvm)	Rpm	Volumen de llenado
1	0.1	150	1.5
2	1	150	1.5
3	0.1	450	3
4	1	450	3
5	0.55	300	2.25
6	0.55	300	2.25
7	0.55	300	2.25
8	0	300	2.25

Como se puede ver en la Figura 3, se puede observar un efecto claro de tener una cubierta de nitrógeno sobre la separación de impurezas relacionadas con el producto. La Extracción #8, donde no se aplicó cubierta de nitrógeno, tiene niveles significativamente superiores de impurezas relacionadas con el producto. Por otro lado, la figura también sugiere que la velocidad de cubierta de nitrógeno podría tener un efecto en la separación de esta impureza, comparando las extracciones 1 a 2, y 7 a 8.

Ejemplo 3

La fermentación de conformidad con el proceso A y la recolección celular se llevaron a cabo como se describe anteriormente. Las células hospedadas resuspendidas se ajustaron a pH 7.2 por la adición de 2.5 M de base Tris al amortiguador de extracción, inmediatamente previo a la extracción. Esta extracción con calor se realizó ya sea en la

presencia o ausencia de una cubierta de nitrógeno. Donde sea aplicable, la cubierta de nitrógeno se mantiene gasificando el espacio de cabeza del contenedor a 1 vvm usando 100% de Nitrógeno.

5 En la Figura 4, las extracciones 1 a 3 se realizaron en la presencia de una cubierta de nitrógeno, mientras las extracciones 4 a 6 se cubrieron con aire. Los resultados muestran nuevamente el beneficio de la presencia de nitrógeno, resultando en niveles significativamente
10 reducidos de impurezas relacionadas con el producto que permanecen después de la extracción de calor. Un efecto benéfico adicional se deriva del ajuste de pH realizado previo a una extracción de calor, ya que los niveles de impurezas relacionadas con el producto parecen ser además
15 reducidas en comparación con los ejemplos previos.

Ejemplo 4

También se analizó el efecto de extracción bajo condiciones de reducción a una escala más pequeña, es decir, usando matraces sacudidos.

20 25-100 mL de cultivo celular inducido por proteína se recolectaron y resuspendieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL por la adición de agua y amortiguador de extracción 3x (pH 7.4) a una concentración de amortiguador de extracción final 1x (10 mM de EDTA, 100 mM de Tris). Los matraces tienen
25 un sello de obturación y se elaboraron de policarbonato para

minimizar la permeabilidad de oxígeno en el matraz. La cubierta de nitrógeno se agregó a la fase gaseosa de los matraces usando una guantera desechable (Aldrich AtmosBag, cat #Z530220) con un flujo continuo de nitrógeno a través de la guantera. Los matraces se sellaron antes de ser removidos de la guantera y llevar a cabo la extracción con calor. Las muestras también se prepararon en el banco (con aire como una cubierta en la fase gaseosa de los matraces) para comparación. La extracción de calor se llevó a cabo a 60°C por 10 h en una incubadora de matraz sacudido (New Brunswick Innova42). El potencial rédox se midió en cada post-extracción del matraz usando sondas Broadley James ORP. La etapa de tratamiento con calor también se llevó a cabo a diferentes volúmenes de llenado de matraz para evaluar el efecto de área de superficie diferente a relaciones de volumen en la extracción de proteína. La Tabla 3 resume las condiciones experimentales probadas.

Tabla 3.

Número de Extracción	Preparación	Volumen de llenado (mL)
1	Nitrógeno	25
2	Nitrógeno	50
3	Nitrógeno	100
4	Aire	25
5	Aire	50
6	Aire	100

La Figura 5 demuestra que los matraces sacudidos los cuales se prepararon en la presencia de una cubierta de nitrógeno, mantienen un ambiente más reductor en el extracto que los matraces los cuales se prepararon en la presencia de
5 aire. La figura 5 también muestra que los matraces con un volumen de llenado más grande fueron más reductores que aquellos con un volumen de llenado más pequeño, probablemente debido a una velocidad de oxidación más lenta del extracto debido a la relación de área de superficie más pequeña a
10 volumen. Los matraces preparados en aire todos tienen un valor de potencial rédox de punto final positivo, sin correlación al volumen de llenado.

La Figura 6 muestra que los matraces sacudidos los cuales se prepararon bajo nitrógeno tienen niveles
15 significativamente inferiores de impurezas relacionadas con el producto post-extracción. Todos los matraces preparados con nitrógeno (intervalo de potencial rédox de punto final -10 mV a -1 16 mV) demuestran niveles de impureza relacionados con el producto significativamente inferiores que todos los
20 matraces preparados en aire (intervalo potencial rédox de punto final +79 mV a +97 mV).

Ejemplo 5

La unión de Fab' específicamente a TNF-alfa humano tiene una temperatura de fusión superior (T_m) que las HCPs
25 (proteínas de células hospederas), una característica que es

explotada durante la etapa de tratamiento con calor. El calentamiento desnaturaliza una cantidad significativa de HCPs e impurezas relacionadas con el producto causando que sean agregadas y sean separadas durante las etapas de extracción.

5 Sin embargo, como se describe en los ejemplos precedentes, la separación de estas impurezas es mayormente mejorada cuando se aplica una cubierta de nitrógeno, dado el potencial de rédox reducido. El ambiente reductor se cree facilita la separación de las impurezas debido a la reducción de la unión
10 intra-cadena de estas especies durante el calentamiento, lo cual podría resultar en una disminución de la temperatura de fusión en las impurezas.

Con el fin de confirmar lo anterior, la temperatura de fusión de las dos especies principales de impurezas
15 relacionadas con el producto se midió bajo condiciones reductoras y no reductoras. Estas condiciones reductoras se lograron usando TCEP-HCL (Tris clorhidrato de (2-carboxietilo)fosfina), para imitar el ambiente creado por la cubierta de nitrógeno realizada durante la extracción.

20 Se realizaron mediciones usando un ensayo Thermofluor, con base en el uso de un fluoróforo hidrofóbico que se une a la proteína proporciona que alguna o todas sus áreas hidrofóbicas estén expuestas. En este caso particular, el fluoróforo fue SYPRO orange (concentración 5000X en DMSO;
25 Life Technologies S-6650). Esto permite al proceso sin

plegado ser monitoreado bajo condiciones de desnaturalización (por ejemplo, incrementando las temperaturas) midiendo la fluorescencia emitida por el tinte cuando se une a la proteína, usando una PCR en tiempo real (sistema de PCR en tiempo real rápido 7900HT, de Life Technologies). Las muestras son incubadas a temperaturas incrementadas (de 25°C a 99°C con una retención de 30 segundos y un incremento de 0.5°C) y se registró la emisión de fluorescencia. Los datos se trazaron y el punto de fusión de la proteína se determinó encontrando el punto de inflexión de la inclinación.

En este caso, las dos impurezas purificadas relacionadas con el producto, se midieron en amortiguador de citrato-fosfato a pH 5.0 y 7.0 y salina de amortiguador de fosfato a pH 7.4. Se usaron dos diferentes concentraciones de TCEP-HCL para lograr una relación molar de agente reductor: proteína de 2:1 y 10:1, y una muestra sin TCEP-HCL se corrió al lado como un control.

La Figura 7 muestra los resultados para la determinación de la estabilidad térmica para las dos especies principales de impurezas relacionadas con el producto. El potencial redox y estabilidad térmica (temperatura de fusión) son mostrados por correlacionarse; a inferior el potencial redox, inferior la temperatura de fusión de la proteína. Un efecto similar puede ser descrito para el pH cuando llega a ser más neutral. Ambas variables podrían hacer a las

impurezas relacionadas con el producto más propensas a la degradación, por lo tanto, facilitando su separación.

Conclusiones

En total, los datos demuestran la importancia de
5 mantener un ambiente de reducción (potencial rédox bajo)
durante la etapa de calentamiento para permitir una reducción
significante en los niveles de impurezas relacionadas con el
producto durante la extracción de proteína. Además, los datos
demuestran que este ambiente de reducción es permitido a
10 través de la aplicación de una cubierta de nitrógeno y que
cuando no existe cubierta de nitrógeno, el potencial rédox
del ambiente es significativamente menos reductor lo cual
resulta en niveles superiores de impurezas relacionadas con
el producto.

15

20

25