

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

1. Un método para manufacturar un anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno acoplado a una molécula de PEG, que comprende un residuo de cisteína en la región bisagra, caracterizado por que comprende:
 - a) cultivar una célula hospedera de *Escherichia coli* bajo condiciones tales que exprese el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno en el periplasma,
 - b) someter las células hospederas a un tratamiento con calor,
 - c) purificar dicho anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno a partir de una mezcla que contiene las células hospederas y otros contaminantes, en donde dicha purificación comprende una etapa de cromatografía que sirve de etapa de captura del anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno, y una etapa subsecuente de cromatografía sin afinidad y en donde un agente reductor se agrega a dicha mezcla y el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno se mantiene en presencia de dicho agente reductor a partir de la primera etapa de cromatografía hasta la última etapa de cromatografía, en donde el agente reductor es 0.5 mM a 2 mM de glutatona,
 - d) agregar PEG al anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno,
 - e) acoplar el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno a PEG mediante un enlace covalente al residuo de cisteína de la región bisagra del anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno, y
 - f) recuperar dicho anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno acoplado a PEG.
2. El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado por que el agente reductor es removido del anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno recuperado en el paso c).
3. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que dicho fragmento de unión a antígeno es un Fab'.
4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes,

caracterizado por que dicha molécula de PEG es PEG-maleimida 40,000.

5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la purificación del anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de la etapa c) comprende una primera etapa de cromatografía que es una cromatografía de intercambio catiónico a partir de la cual un primer eluato que contiene el anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno es eluido, y una segunda etapa de cromatografía que es una cromatografía de intercambio aniónico para producir un flujo continuo que contiene el anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno.