Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

P- 2021/38826

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2022/0000660**
Solicitud de patente a nombre de **REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., domiciliada en Nueva York, Estados Unidos, solicitantes de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **15873** notificado electrónicamente el 3 de octubre de 2022, relacionado con los requerimientos de fondo de la solicitud, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Título

En primera medida, con respecto a la observación sobre la falta de relación del título con el objeto de la solicitud contenido en la descripción y las reivindicaciones, me permito señalar que es deseo del solicitante modificar el título siguiendo la amable recomendación realizada por el examinador, de modo que ahora se lee:

"MÉTODO PARA CONTROLAR LA COLORACIÓN AMARILLO-MARRÓN DURANTE LA PRODUCCIÓN DE AFLIBERCEPT EN UN MEDIO QUIMICAMENTE DEFINIDO (CDM)"

En vista de lo anterior, amablemente solicito que la objeción al respecto se dé por superada.

2. Modificación a la Solicitud

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto a este memorial un nuevo capítulo descriptivo y reivindicatorio, los

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

cuales reemplazan completamente los documentos presentados el 30 de junio de 2022. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

2.1 Modificación a las reivindicaciones

El solicitante presenta junto a este memorial un capítulo que consiste en dieciséis (16) reivindicaciones, en donde se corrigieron errores tipográficos y de redacción a lo largo del capítulo reivindicatorio, por ejemplo:

- Se corrigieron errores de traducción en la reivindicación 1.
- Se realizó una corrección de unidades en la reivindicación 1, literal (b) iv, pasando de 10,0 µM a mM. Esta corrección encuentra soporte en las líneas 13 y 14 de la página 26.
- Se corrigió el enlace gramatical empleado en la reivindicación 5.
- En las reivindicaciones 4, 15 y 16 se cambió "*antioxidante único"* por "*antioxidante individual"* con el fin de homogenizar el término.
- Se modificó la expresión "*que consiste de" a* "*que consiste en*".
- En la reivindicación 8 se reemplazó la expresión "*las mismas"* por "*los mismos"* ya que hace referencia a los residuos de aminoácido oxidado.
- Se ajustó la redacción de la reivindicación 15 de manera que corresponde completamente a la reivindicación 15 de la patente estadounidense concedida US11104715B2. Así, se eliminó la referencia a "*menor que o igual a 0,4 µM o"* en el literal (b) y la referencia a la recolección en el literal (c).

Estas modificaciones no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud, y se realizan con el fin de definir la materia reclamada de forma clara y superar las objeciones planteadas por el examinador en su concepto técnico.

2.2 Modificación a la Descripción

Por otra parte, el solicitante presenta junto a este memorial un nuevo capítulo descriptivo en que se han realizado modificaciones a fin de corregir errores relacionados con la traducción de la solicitud.

3. Claridad y concisión de las reivindicaciones

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones presentadas por la examinadora en

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

su concepto técnico, de modo tal que las nuevas reivindicaciones reclaman de manera clara y concisa la invención descrita. Con respecto a las objeciones específicas del examinador, me permito manifestar lo siguiente:

3.1 El examinador señala que La reivindicación 1 no es clara porque presenta errores tipográficos en el preámbulo y parte caracterizante.

Frente a lo anterior, amablemente me permito señalar que se modificó la reivindicación 1, con el fin de arreglar los errores tipográficos señalados por el examinador. En particular, se agregó la preposición "de" en el preámbulo de la reivindicación, y se cambió la expresión "es mejor que" por "es menor que" en el inciso (b)i.

3.2 El examinador también menciona que Las reivindicaciones 1, 15 y 16 no son claras porque, la expresión "*bajo condiciones adecuadas*" es imprecisa y no permite determinar los componentes y condiciones necesarias para que el método sea reproducido.

Con respecto a esta objeción, me permito resaltar que el desacuerdo del solicitante, toda vez que las reivindicaciones establecen todas las características técnicas necesarias para que la persona normalmente versada en la materia pueda reproducir el método de la invención.

Los inventores observaron que cuando se produce aflibercept usando varios tipos de medio químicamente definido (CDM), la muestra de proteína tiene un color amarillo-marrón. Las fracciones de color amarillo-marrón estaban particularmente enriquecidas en ciertas especies oxidadas de aflibercept (ver Página 2 líneas de la 22 a la 32 de la descripción). El concepto inventivo clave en esta solicitud no radica en la producción del color amarillo-marrón o de la especie ácida usando condiciones adecuadas, sino más bien en los pasos que se toman <u>para reducir</u> la coloración y el nivel de especies ácidas una vez que se han producido.

Las reivindicaciones de la presente invención, sin embargo, se ocupan específicamente del problema de eliminar el color marrón amarillento cuando surge mediante la producción de aflibercept en un CDM. Dado que el color amarillo-marrón es un fenómeno que se ha observado desde que los inventores comenzaron a producir aflibercept usando CDM, y también se observa con CDM disponibles en el mercado, un experto en la materia no tendría ninguna dificultad para llevar a cabo este primer paso de producir aflibercept en un CDM.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Ahora bien, dado que las características mencionadas en las reivindicaciones permiten separar la materia reclamada del estado de la técnica, como bien lo reconoce el examinador en el Oficio de la providencia, la definición de otras características es innecesaria.

De otro lado, es pertinente señalar que definir condiciones específicas en la etapa de cultivo, como lo sugiere el examinador, daría lugar a una protección restringida que permitiría a terceros aprovechar el concepto inventivo desarrollado por los inventores haciendo cambios de rutina en las condiciones de cultivo.

De este modo, amablemente solicito tener en cuenta estos argumentos y dar por superada la objeción.

3.3 Finalmente, el examinador menciona que la reivindicación 5 no sería clara porque la expresión "*en donde porque*" dificulta la comprensión de la materia a reclamar.

Con respecto a esta objeción me permito resaltar que, tal como se mencionó previamente, se modificó la reivindicación 5 eliminando la palabra "*porque*", atendiendo así a la sugerencia del examinador.

En vista de lo anterior, las objeciones relacionadas con la claridad, la concisión y el soporte en la descripción del capítulo reivindicatorio, han quedado completamente superadas.

4. Descripción

El examinador indica que la descripción no divulga la materia reclamada de manera suficiente, clara y completa para que una persona normalmente versada en la materia pueda ejecutarla, por lo que no cumpliría con las disposiciones del Art. 28 de la Decisión Andina 486. Específicamente, se menciona que en el capítulo descriptivo de la solicitud no es claro dado que presenta errores tipográficos específicamente en lo que se refiere a la palabra "*fierro",* cuando en realidad se refería al "*hierro".*

Frente a lo anterior, me permito reiterar que junto al presente memorial se presenta un nuevo capítulo descriptivo en donde se realizaron las correcciones correspondientes. Además, se sustituyó el término "*consiste de"* por *"consiste en".*

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

De este modo, de manera cordial se solicita al examinador tener en cuenta los argumentos y aclaraciones en cuanta para reevaluar el cumplimiento del Art. 28 de la Decisión Andina 486.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, y dado que en el Oficio No. 15873, no se presentaron objeciones con respecto a la novedad y el nivel inventivo de la materia reclamada, amablemente me permito solicitar que se continue con el trámite de la presente solicitud y se otorgue el privilegio de patente solicitado para la misma.

5. Pago de Tasas

Considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones, se adjunta recibo por concepto de pago de tasa de modificación a la solicitud, según lo establecido en la **Resolución 59669 de 2020.**

Ahora, en relación con el número de reivindicaciones, atentamente me permito resaltar que junto a la presente respuesta no se realiza el pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio cuenta con el mismo número de reivindicaciones que el anteriormente presentado y estudiado por su Despacho.

6. Conclusión

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

i) El nuevo título de la solicitud es claro y se relaciona con el objeto reclamado, cumpliendo así con el literal d) del artículo 27 de la Decisión 486 de 2000;

ii) El nuevo pliego reivindicatorio se ajusta a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486/00;

iii) La invención de la presente solicitud es clara y cuenta con el debido sustento en el capítulo descriptivo, a la vez que se encuentra divulgada de manera suficientemente completa, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 28 y 30 de la Decisión 486;

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

iv) La invención de la presente solicitud no había sido divulgada previamente en el estado de la técnica cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 16 de la Decisión 486, y

v) La invención de la presente solicitud no resulta obvia ni se derivada de manera evidente del estado de la técnica, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 18 de la Decisión 486.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486 de 2000.

Asimismo, respetuosamente solicito a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

7. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por dieciséis (16) reivindicaciones.
- Nuevo capítulo descriptivo.
- Recibo de pago por concepto de modificaciones voluntarias.

Señora Directora,

CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir aflibercept recolectado a partir de una célula hospedera cultivada en un medio químicamente definido (CDM), que comprende:
   (a) proporcionar una célula hospedera diseñada por ingeniería genética para expresar aflibercept;
   (b) cultivar tal célula hospedera en tal CDM bajo condiciones adecuadas en las cuales dicha célula expresa dicho aflibercept, en donde la concentración acumulativa de niquel en dicho CDM es menor o igual a 0,4 μM, o alrededor de 0,4 μM, y uno o más de los siguientes:
      i. la concentración acumulativa de hierro en dicho CDM es menor que, o igual a, 55,0 μM;
      ii. la concentración acumulativa de cobre en dicho CDM es menor que, o igual a 0,8 μM;
      iii. la concentración acumulativa de zinc en dicho CDM es menor que, o igual a, 56,0 μM;
      iv. la concentración acumulativa de cisteína en dicho CDM es menor que, o igual a, 10,0 mM, y
      v. dicho CDM contiene antioxidantes, en donde la concentración acumulativa de un antioxidante está entre 0,001 mM y 10,0 mM aproximadamente para cualquier antioxidante individual; y
   (c) recolectar el aflibercept producido por la célula hospedera.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha recolección tiene un color no más amarillo-marrón que el color europeo estándar BY2, en donde la concentración de aflibercept es 5,0 g/L.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, en donde los antioxidantes son taurina, hipotaurina, glicina, ácido tióctico, glutatión, colina, hidrocortisona, vitamina C, Vitamina E o una combinación de los mismos.

4. El método de conformidad con la reivindicación 2, en donde la concentración acumulativa de un antioxidante en tal CDM es aproximadamente 0,001 mM hasta aproximadamente 10,0 mM para cualquier antioxidante individual, y la concentración acumulativa de todos los antioxidantes es menor o igual a 30,0 mM.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el titulador de aflibercept, la concentración de células viables, la viabilidad, el amoniaco o la osmolalidad permanecen sustancialmente inalterados.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque tal célula hospedera se selecciona a partir del grupo que consiste en CHO, NS0, Sp2/0, células renales embriónicas y BHK.

7. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque tal recolección comprende una o más variantes de aflibercept, en donde tales variantes tienen al menos un residuo de aminoácido oxidado.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque tal residuo de aminoácido oxidado se selecciona a partir del grupo que consiste en metionina, triptófano, histidina, fenilalanina, tirosina y combinaciones de los mismos.

9. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el residuo de aminoácido oxidado es histidina.

10. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el residuo de aminoácido oxidado es triptofano.

11. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque la variante de aflibercept comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido

seleccionada a partir del grupo que consiste en: SEQ ID NO.: 17, SEQ ID NO.: 18, SEQ ID NO.: 19, SEQ ID NO.: 20, SEQ ID NO.: 21, SEQ ID NO.: 22, SEQ ID NO.: 23, SEQ ID NO.: 62, SEQ ID NO.: 63, SEQ ID NO.: 64, SEQ ID NO.: 65, SEQ ID NO.: 66, SEQ ID NO.: 67, SEQ ID NO.: 68, SEQ ID NO.: 69, SEQ ID NO.: 70, SEQ ID NO.: 71 y combinaciones de las mismas.

12. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque dichos antioxidantes son taurina, hipotaurina, glicina, ácido tióctico, glutationa, colina, hidrocortisona, Vitamina C, Vitamina E o combinaciones de los mismos.

13. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la recolección tiene un color que es:
    a. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY2;
    b. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY3;
    c. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY4;
    d. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY5;
    e. entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY3; o
    f. entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY4, y

    en donde la concentración de aflibercept en la recolección es 5,0 g/L.

14. El método de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el color de la recolección es caracterizado en el espacio de color L*, a*, b*, de CIE, donde L* es aproximadamente 70 hasta aproximadamente 99, a* es aproximadamente 0 y b* es aproximadamente 20 o menos de 20 cuando la concentración de aflibercept es 5,0 g/L.

15. Un método para producir aflibercept recolectado a partir de una célula hospedera cultivada en un medio químicamente definido (CDM), caracterizado porque comprende:
    (a) proporcionar una célula hospedera diseñada por ingeniería genética para

expresar aflibercept;

(b) cultivar tal célula hospedera en tal CDM bajo condiciones adecuadas en las cuales dicha célula hospedera expresa tal aflibercept, en donde la concentración acumulativa de níquel en tal CDM es aproximadamente 0,4 μM y uno o más de los siguientes:

i. la concentración acumulativa de hierro en tal CDM es menor que o igual a 55,0 μM;

ii. la concentración acumulativa de cobre en tal CDM es menor que o igual a 0,8 μM;

iii. la concentración acumulativa de zinc en tal CDM es menor que o igual a 56,0 μM;

iv. la concentración acumulativa de cisteína en tal CDM es menor que o igual a 10,0 mM; y

v. dicho CDM incluye antioxidantes, donde la concentración acumulativa de un antioxidante es aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 10,0 mM para cualquier antioxidante individual; y

(c) recolectar el aflibercept producido por tal célula hospedera, donde el color de dicha cosecha es:

a. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY2;

b. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY3;

c. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY4;

d. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY5;

e. entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY3; o

f. entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY4,

en donde la concentración de aflibercept es 5,0 g/L.

16. Un método para producir aflibercept recolectado a partir de una célula hospedera cultivada en un medio químicamente definido (CDM), caracterizado porque comprende:

(a) cultivar tal célula hospedera en tal CDM bajo condiciones adecuadas en las

cuales dicha célula hospedera expresa tal aflibercept, en donde la concentración acumulativa de níquel en tal CDM es menor que o igual a 0,4 μM o aproximadamente 0,4 μM y uno o más de los siguientes;

i. la concentración acumulativa de hierro en tal CDM es menor que o igual a 55,0 μM;

ii. la concentración acumulativa de cobre en tal CDM es menor que o igual a 0,8 μM;

iii. la concentración acumulativa de zinc en tal CDM es menor que o igual a 56,0 μM;

iv. la concentración acumulativa de cisteína en tal CDM es menor que o igual a 10,0 mM; y

v. dicho CDM incluye antioxidantes, donde la concentración acumulativa de un antioxidante es aproximadamente 0,001 mM hasta aproximadamente 10,0 mM para cualquier antioxidante individual; y

(b) recolectar el aflibercept producido por dicha célula hospedera.

P-2021/38826
Descripción modificada para respuesta a Oficio N° 15873
9 de febrero de 2023

MÉTODO PARA CONTROLAR LA COLORACIÓN AMARILLO-MARRÓN DURANTE LA PRODUCCIÓN DE AFLIBERCEPT EN UN MEDIO QUIMICAMENTE DEFINIDO (CDM)

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad a, y el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional Estadounidense No. 63/065,012, presentada el 13 de agosto de 2020, el contenido de la cual se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Esta solicitud también reivindica la prioridad a y el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional No. 62/944,635, presentada el 6 de diciembre de 2019.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias el cual se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y está de este modo incorporada por referencia en su totalidad. Tal copia ASCII, creada el 26 de agosto de 2021 es nombrada 070816-02259_SL.txt y es de 148,919 bytes de tamaño.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención en general pertenece a composiciones anti-VEGF y métodos para producir las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las composiciones biofarmacéuticas a base de proteína han emergido como productos importantes para búsqueda, el tratamiento de enfermedades oftalmológicas, cáncer, enfermedad autoinmune, e infección, así como también otras enfermedades y trastornos. Los biofarmacéuticos representan uno de los segmentos de producto que crece más rápidamente de la industria farmacéutica.

Una clase de mitógenos diméricos derivados de la célula con selectividad para células endoteliales vasculares se ha identificado y designado el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF, por sus siglas en inglés).

La angiogénesis persistente puede causar o exacerbar ciertas enfermedades tales como psoriasis, artritis reumatoide, hemangiomas, angiofibromas, retinopatía diabética y glaucoma neovascular. Un inhibidor de la actividad de VEGF podría ser útil como un tratamiento para tales enfermedades y otras angiogénesis patológicas inducidas por VEGF y condiciones de permeabilidad vascular, tales

como vascularización tumoral. Las angiopoyetinas y miembros de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) son los únicos factores de crecimiento que se piensa son ampliamente específicos para células endoteliales vasculares.

Varios trastornos oculares están asociados con la angiogénesis patológica. Por ejemplo, el desarrollo de degeneración macular relacionada con la edad (AMD, por sus siglas en inglés), está asociada con un proceso llamado neovascularización coroidal (CNV, por sus siglas en inglés). La Fuga de la CNV causa edema macular y recolección del fluido detrás de la mácula que resulta en pérdida de la visión. El edema macular diabético (DME, por sus siglas en inglés), es otro trastorno ocular con un componente angiogénico. El DME es la causa más prevalente de pérdida de visión moderada en pacientes con diabetes y es una complicación común de retinopatía diabética, una enfermedad que afecta los vasos sanguíneos de la retina. El DME clínicamente significante ocurre cuando el fluido se fuga en el centro de la mácula, la parte sensible a la luz de la retina responsable de la visión directa, borrosa. El fluido en la mácula puede causar pérdida severa de la visión o ceguera.

Varios inhibidores de VEGF, tales como la trampa del VEGF EYLEA® (aflibercept), se han aprobado para tratar tales trastornos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a proteínas anti-VEGF que incluyen la proteína de trampa del VEGF aflibercept, la cual es una proteína de fusión. La presente invención también pertenece a una nueva proteína anti-VEGF, la MiniTrampa del VEGF aflibercept (colectivamente referida como MiniTrampa a menos que se indique de otro modo). Se describen en la presente métodos para elaborar estas proteínas anti-VEGF, que incluyen modalidades de producción que proporcionan medios eficientes y efectivos para producir las proteínas de interés. En un aspecto, la presente invención se dirige hacia el uso de medio químicamente definido (CDM, por sus siglas en inglés) para producir proteínas anti-VEGF. En un aspecto particular, los CDMs de interés son aquellos que, cuando se usan, producen una muestra de proteína en donde la muestra tiene un color amarillo-marrón y puede comprender especies oxidadas. Todavía, además, en la presente solicitud, las variantes de proteína de aflibercept y MiniTrampa del VEGF se describen junto con los métodos de producción asociados.

Producción de Aflibercept

La presente descripción describe la producción de aflibercept usando un medio de cultivo celular. En una modalidad, el medio de cultivo celular es un medio químicamente definido (“CDM”). El CDM es a menudo usado debido a que es una fórmula químicamente definida, libre de proteína que no usa componentes derivados de animales y existe certidumbre en cuanto a la composición del medio. En otra modalidad, el medio de cultivo celular es un medio de hidrolizado de soya.

En una modalidad, un método para producir una proteína recombinante comprende: (a) proporcionar una célula hospedera diseñada por ingeniería genética para expresar una proteína recombinante de interés; (b) cultivar la célula hospedera en un CDM bajo condiciones adecuadas en las cuales la célula expresa la proteína recombinante de interés; y (c) recolectar una preparación de la proteína recombinante de interés producida por la célula. En un aspecto, la proteína recombinante de interés es una proteína anti-VEGF. En un aspecto particular, la proteína anti-VEGF se selecciona a partir del grupo que consiste en aflibercept y MiniTrampa recombinante (ejemplos de los cuales se describen en Patente Estadounidense No. 7,279,159), un scFv de aflibercept y otras proteínas anti-VEGF. En un aspecto preferido, la proteína recombinante de interés es aflibercept.

En un aspecto de la presente modalidad, el aflibercept es expresado en una célula hospedera adecuada. Ejemplos no limitantes de tales células hospederas incluyen, pero no se limitan a, CHO, CHO K1, EESYR®, NICE®, NS0, Sp2/0, células renales embriónicas y BHK.

CDMs adecuados incluyen medio Eagle Modificado de Dulbecco (DME, por sus siglas en inglés), Mezcla Nutriente de Ham, medio Excell, y medio IS CHO-CD. Otros CDMs conocidos por aquellos expertos en la técnica también se contemplan por estar dentro del alcance de la presente invención. En un aspecto particular, un CDM adecuado es CDM1B (Regeneron) o Medio Avanzado Excell (SAFC).

En una modalidad, una muestra recolectada clarificada a partir de un cultivo de CDM que comprende aflibercept se somete a un procedimiento de cromatografía de captura. En un aspecto, la etapa de captura es un procedimiento de cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, Proteína A. En un aspecto adicional, lo eluido del procedimiento de afinidad presenta un cierto color, por ejemplo, lo eluido puede presentar un color amarillo-marrón. Como se describe en más detalle *infra*, el color puede ser evaluado usando (i) el Estándar Europeo de Color “BY” en el cual se hace una inspección visual cualitativa o (ii) un ensayo colorimétrico, CIE L*, a*, b* (o CIELAB), el cual es más cuantitativo que el sistema BY. Sin embargo, en cualquier caso, la evaluación de color entre muestras múltiples debe ser normalizada contra la concentración de proteína con el fin de asegurar una evaluación significante. Por ejemplo, con referencia al Ejemplo 9 abajo, lo eluido de la Proteína A tiene un valor “b*” de aproximadamente 2.52 el cual corresponde a un valor BY de aproximadamente BY5 (cuando se mide a una concentración de 5 g/L de proteína en lo eluido de la Proteína A). Si el color de lo eluido de la Proteína A está siendo comparado con otra muestra, entonces la comparación se debe hacer contra la misma concentración de proteína. El valor b* en el espacio de color CIELAB se usa para expresar coloración de las muestras y cubre azul (-) a amarillo (+). Un valor b* superior de una muestra comparado con otro indica una coloración amarillo-marrón más intensa en la muestra comparada entre sí.

En una modalidad, se produce aflibercept a partir de una célula hospedera diseñada por ingeniería genética para expresar aflibercept usando CDM. En un aspecto, otras especies o variantes de aflibercept también se producen. Estas variantes incluyen isoformas de aflibercept que comprenden uno o más residuos de aminoácido oxidados colectivamente referidos como variantes oxo. Una muestra recolectada clasificada producida usando CDM que comprende aflibercept, así como también sus variantes oxo pueden ser sometidas a un procedimiento de cromatografía de captura. En un aspecto, la etapa de captura es un procedimiento de cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, una columna de Proteína A. Cuando una muestra extraída a partir de un eluido de afinidad, el cual puede o no puede manifestar un color amarillo-marrón, se analiza usando, por ejemplo, cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS), una o más variantes oxidadas de aflibercept pueden ser detectadas. Ciertos residuos de aminoácido de un aflibercept modificado se muestran por ser oxidados incluyen, pero no se limitan a, residuos de histidina y/o triptofano. En un aspecto, las variantes pueden incluir oxidación de uno o más residuos de metionina, así como también otros residuos, *véase infra*.

En otro aspecto, las variantes pueden incluir oxidación de uno o más residuos de triptofano para formar N-formilcinurenina. En un aspecto adicional, las variantes pueden incluir oxidación de uno o más residuos de triptofano para formar mono-hidroxil triptofano. En un aspecto particular, las variantes de proteína pueden incluir oxidación de uno o más residuos de triptofano para formar di-hidroxil triptofano. En un aspecto particular, las variantes de proteína pueden incluir oxidación de uno o más residuos de triptofano para formar tri-hidroxil triptofano.

En otro aspecto, las variantes pueden incluir una o más modificaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en: desamidación de, por ejemplo, una o más asparaginas; uno o más ácidos aspárticos convertidos a iso-aspartato y/o Asn; oxidación de una o más metioninas; oxidación de uno o más triptofanos a N-formilcinurenina; oxidación de uno o más triptofanos a mono-hidroxil triptofano; oxidación de uno o más triptofanos a di-hidroxil triptofano; oxidación de uno o más triptofanos a tri-hidroxil triptofano; 3-desoxiglucosonación de Arg de una o más argininas; remoción de glicina C-terminal; y presencia de uno o más glicositos no glicosilados.

En otra modalidad, la invención se dirige a métodos para producir aflibercept. En un aspecto, una muestra recolectada clarificada que comprende aflibercept y sus variantes son sometidas a una etapa de captura tal como cromatografía de afinidad de Proteína A. Subsecuente a la etapa de afinidad, un eluido de afinidad puede ser sometida a cromatografía de intercambio iónico. La cromatografía de intercambio iónico puede ser ya sea cromatografía de intercambio iónico o catiónico. También contemplado por estar dentro del alcance de la presente modalidad está la cromatografía multimodal o de modo mezclado, así como también otros procedimientos

cromatográficos los cuales se discuten además abajo. En un aspecto particular, la cromatografía de intercambio iónico es cromatografía de intercambio aniónico (AEX, por sus siglas en inglés). Condiciones adecuadas para emplear AEX incluyen, pero no se limitan a, clorhidrato de Tris a un pH de aproximadamente 8.3 hasta aproximadamente 8.6. Después del equilibrio usando, por ejemplo, clorhidrato de Tris a un pH de aproximadamente 8.3 hasta aproximadamente 8.6, la columna de AEX se carga con la muestra. Después de cargar la columna, la columna puede ser lavada una o múltiples veces usando, por ejemplo, el amortiguador de equilibrio. En un aspecto particular, las condiciones usadas pueden facilitar el comportamiento cromatográfico diferencial de aflibercept y las variantes oxidadas de manera que una fracción que comprende cantidades significantes ausentes de aflibercept de variantes de oxo se puede recolectar en una fracción de flujo continuo mientras una porción significante de variantes de oxo son retenidas en la fase sólida de la columna de AEX y se puede obtener después de retirar la columna – *véase* Ejemplo 2 abajo, **Figura 11**. Con referencia a la **Figura 11** y Ejemplo 2, se pueden observar cambios en las variantes de oxo entre las diferentes etapas de producción. Por ejemplo, este cambio puede ser ilustrado por datos en la sección de “Nivel de Oxidación de Triptofano (%)”, específicamente, la columna “W138(+16)”. Se puede observar que las variantes de oxo (específicamente, oxo-triptofano) van desde aproximadamente 0.131% en una muestra de carga hasta aproximadamente 0.070% en una muestra de flujo continuo después de la cromatografía de AEX (AEX separación 2), que indica que existe una reducción en las variantes de oxo de aflibercept usando AEX.

El uso de intercambio iónico puede ser usado para mitigar o minimizar el color. En un aspecto de la presente modalidad, una muestra recolectada clarificada se somete a cromatografía de captura, por ejemplo, usando cromatografía de afinidad de Proteína A. La columna de afinidad es eluida y tiene un primer color con un valor BY y/o b* particular asignado a este. Este eluyente de Proteína A es entonces sometido a cromatografía de intercambio iónico tal como cromatografía de intercambio aniónico (AEX). La columna de intercambio iónico se lava y el flujo continuo se recolecta y tiene un segundo color que tiene un valor BY y/o b* particular asignado a este. En un aspecto particular, el valor del color (ya sea “BY” o “b*”) del primer color difiere del segundo color. En un aspecto adicional, el primer color de lo eluido de la Proteína A tiene un color más amarillo-marrón comparado con el segundo color del flujo continuo de AEX como se refleja por el valor BY y/o b* respectivo. Típicamente, existe una reducción en el color amarillo-marrón del segundo color después de AEX cuando se compara con el primer color de lo eluido de la Proteína A. Por ejemplo, el uso de intercambio aniónico reduce el color amarillo-marrón observado en una muestra de lo eluido de la Proteína A, a partir de un valor b* de aproximadamente 3.06 (primer color) hasta aproximadamente 0.96 (segundo color) después de AEX – *véase* Ejemplo 2, **Tabla 2-3** abajo.

En un aspecto de la modalidad, el pH de tanto los amortiguadores de equilibrio como lavado para la columna de AEX puede ser desde aproximadamente 8.30 hasta aproximadamente 8.60. En otro aspecto, la conductividad de tanto los amortiguadores de equilibrio como lavado para la columna de AEX puede ser desde aproximadamente 1.50 hasta aproximadamente 3.00 mS/cm.

En un aspecto de la modalidad, los amortiguadores de equilibrio y lavado pueden ser aproximadamente 50 mM de clorhidrato de Tris. En un aspecto, el amortiguador de extracción comprende 2M de cloruro de sodio o 1N de hidróxido de sodio o ambos (*véase* **Tabla 2-2**).

La presente modalidad puede incluir la adición de una o más etapas, en ningún orden particular, tal como cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de afinidad, cromatografía multimodal, inactivación viral (*por ejemplo,* usando pH bajo), filtración viral, y/o ultra/diafiltración, así como también otras etapas cromatográficas bien conocidas.

En una modalidad, la proteína anti-VEGF es glicosilada en una o más asparaginas como sigue: glicosilación G0-GlcNAc; glicosilación G1-GlcNAc; glicosilación G1S-GlcNAc; glicosilación G0; glicosilación G1; glicosilación G1S; glicosilación G2; glicosilación G2S; glicosilación G2S2; glicosilación G0F; glicosilación G2F2S; glicosilación G2F2S2; glicosilación G1F; glicosilación G1FS; glicosilación G2F; glicosilación G2FS; glicosilación G2FS2; glicosilación G3FS; glicosilación G3FS3; glicosilación G0-2GlcNAc; glicosilación Man4; glicosilación Man4_A1G1; glicosilación Man4_A1G1S1; glicosilación Man5; glicosilación Man5_A1G1; glicosilación Man5_A1G1S1; glicosilación Man6 glicosilación; Man6_G0+Fosfato; glicosilación Man6+Fosfato; y/ o glicosilación Man7. En un aspecto, la proteína anti-VEGF puede ser aflibercept, anticuerpo anti-VEGF o MiniTrampa del VEGF.

En un aspecto, el perfil de glicosilación de una composición de una proteína anti-VEGF es como sigue: aproximadamente 40 % hasta aproximadamente 50% de glicanos fucosilados totales, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 55% de glicanos sialilados totales, aproximadamente 6% hasta aproximadamente 15% de manosa-5, y aproximadamente 60% hasta aproximadamente 79% de glicanos galactosilados (véase Ejemplo 6). En un aspecto, la proteína anti-VEGF tiene glicosilación de Man5 a aproximadamente 32.4% de 123 residuos de asparagina y/o aproximadamente 27.1% de 196 residuos de asparagina.

En una modalidad, el proceso puede comprender, además, formular una sustancia de fármaco usando un excipiente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto de la modalidad, el excipiente farmacéuticamente aceptable se puede seleccionar a partir de los siguientes: agua, agentes amortiguadores, azúcar, sal, tensoactivo, aminoácido, poliol, agente quelante, emulsificador y preservativo. Otros excipientes bien conocidos para los expertos en la técnica están dentro del punto de vista de esta modalidad.

En un aspecto de la modalidad, la formulación puede ser adecuada para administración a un sujeto humano. En particular, la administración puede ser afectada por inyección intravítrea. En un aspecto, la formulación puede tener aproximadamente 40 hasta aproximadamente 200 mg/mL de la proteína de interés.

La formulación puede ser usada como un método para tratar o prevenir trastornos oculares angiogénicos los cuales pueden incluir: degeneración macular relacionada con la edad (*por ejemplo,* húmeda o seca), edema macular, edema macular después de la oclusión de la vena retinal, oclusión de la vena retinal (RVO, por sus siglas en inglés), oclusión de la vena retinal central (CRVO, por sus siglas en inglés), oclusión de la vena retinal central ramificada (BRVO, por sus siglas en inglés), edema macular diabético (DME, por sus siglas en inglés), neovascularización coroidal (CNV, por sus siglas en inglés), neovascularización del iris, glaucoma neovascular, fibrosis post-quirúrgica en glaucoma, vitreoretinopatía proliferativa (PVR, por sus siglas en inglés), neovascularización del disco óptico, neovascularización corneal, neovascularización retinal, neovascularización vítreal, pannus, ptergio, retinopatía vascular, retinopatía diabética en un sujeto con edema macular diabético; o retinopatías diabéticas (*por ejemplo,* retinopatía diabética no proliferativa (*por ejemplo,* caracterizada por un nivel de Escala de Severidad de Retinopatía Diabética (DRSS, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 47 o 53) o retinopatía diabética proliferativa; *por ejemplo,* en un sujeto que no sufre de DME).

Producción de MiniTrampa del VEGF

La presente descripción describe la producción de una versión modificada de aflibercept en donde la porción Fc es removida o ausente y es referida como MiniTrampa de aflibercept o MiniTrampa del VEGF. Esta MiniTrampa se puede producir en medio de cultivo celular que incluye un medio químicamente definido (CDM) o medio hidrolizado de soya.

En una modalidad, la MiniTrampa se produce usando CDM. En un aspecto de producción de MiniTrampa, se produce aflibercept de longitud completa usando un hospedero adecuado y bajo condiciones adecuadas y se procesa además mediante la porción Fc que es enzimáticamente removida de este modo proporcionando MiniTrampa. Alternativamente, un gen que codifica la MiniTrampa (*por ejemplo,* una secuencia de nucleótido que codifica aflibercept ausente su porción Fc) se puede producir bajo condiciones adecuadas usando una célula hospedera adecuada.

En una modalidad, un método para manufacturar MiniTrampa incluye producir una proteína de fusión de aflibercept de longitud completa seguida por escisión de la región Fc. En un aspecto, el método involucra producir una proteína recombinante, es decir una proteína de fusión de aflibercept de longitud completa (*véase*, Patente Estadounidense No. 7,279,159, las enseñanzas completas de la cual se incorporan en la presente por referencia), que comprende: (a) proporcionar una célula

hospedera diseñada por ingeniería genética para expresar aflibercept de longitud completa; (b) cultivar la célula hospedera en CDM bajo condiciones adecuadas en las cuales la célula expresa el aflibercept de longitud completa; (c) recolectar una preparación del aflibercept de longitud completa producido por la célula; y (d) someter el aflibercept de longitud completa a escisión enzimática específica para remover la porción Fc de la proteína de fusión. En otro aspecto, una secuencia de nucleótido que codifica a aflibercept menos su porción Fc se expresa a partir de una célula hospedera adecuada bajo condiciones adecuadas bien conocida por aquellos expertos en la técnica (*véase* Patente Estadounidense No. 7,279,159).

En un aspecto de la presente modalidad, el aflibercept es expresado en una célula hospedera adecuada. Ejemplos no limitantes de tales células hospederas incluyen, pero no se limitan a, CHO, CHO K1, EESYR®, NICE®, NS0, Sp2/0, células renales embriónicas y BHK.

CDMs adecuados incluyen Medio Eagle Modificado de Dulbeco (DME), Mezcla Nutriente de Ham, medio EX-CELL (SAFC), y medio IS CHO-CD (Irvine). Otros CDMs conocidos por aquellos expertos en la técnica también están contemplados por estar dentro del alcance de la presente invención. En un aspecto particular, un CDM adecuado es CDM1B (Regeneron) o medio Excell (SAFC).

En un aspecto, durante la producción de MiniTrampa, una muestra que comprende una proteína de interés (*es decir,* proteína de fusión aflibercept y/o MiniTrampa) junto con sus variantes (que incluye variantes de oxo) puede presentar ciertas propiedades de color – un color amarillo-marrón. Por ejemplo, una muestra eluida a partir de una etapa de cromatografía de afinidad puede presentar un cierto color amarillo-marrón medido usando el sistema BY y/o b* (*véase* Ejemplos 2 y 9 abajo). Fuentes ejemplares para una “muestra” pueden incluir una cromatografía de afinidad, tal como elución de Proteína A; la muestra se puede obtener a partir de una fracción de flujo continuo de procedimiento de cromatografía de intercambio iónico; también se puede obtener a partir de la extracción de una columna de intercambio iónico – existen otras fuentes durante un proceso de producción bien conocido por aquellos expertos en la técnica a partir de los cuales una muestra puede ser analizada. Como se menciona anteriormente y se describe además abajo, el color puede ser evaluado usando (i) el Estándar Europeo de Color “BY” en el cual se hace una inspección visual cualitativa o (ii) un ensayo colorimétrico, CIELAB, el cual es más cuantitativo que el sistema BY. Sin embargo, en cualquier caso, la evaluación de color entre muestras múltiples debe ser normalizada, por ejemplo, usando concentración de proteína, con el fin de asegurar una evaluación significante entre muestras.

En un aspecto de la presente modalidad, una proteína de fusión de aflibercept de longitud completa puede ser sometida a procesamiento enzimático (“actividad de escisión”) con el fin de generar una MiniTrampa del VEGF, por ejemplo, usando digestión proteolítica empleando una proteasa o

variante enzimáticamente activa de la misma. En un aspecto de esta modalidad, la proteasa puede ser una enzima de degradación de inmunoglobulina de *Streptococcus pyogenes* (IdeS). En otro aspecto, la proteasa puede ser tripsina de trombina, endoproteinasa Arg-C, endoproteinasa Asp-N, endoproteinasa Glu-C, otra proteasa T de la membrana exterior (OmpT), IdeS, quimiotripsina, pepsina, termolisina, papaína, pronasa, o proteasa de *Aspergillus saitoi*. En un aspecto, la proteasa puede ser una cisteína proteasa. En un aspecto particular de la modalidad, la proteasa puede ser IdeS. En otro aspecto, la proteasa puede ser una variante de IdeS. Ejemplos no limitantes de variantes de IdeS se describen *infra* e incluyen un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido como se expone en el grupo que consiste en la SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15 y SEQ ID NO.: 16. En un aspecto, la proteasa puede ser inmovilizada en agarosa u otra matriz adecuada.

En un aspecto, una proteína de interés (junto con sus variantes) se produce usando CDM. En un aspecto particular, la proteína de interés incluye aflibercept o MiniTrampa. Las variantes comprenden uno o más residuos de aminoácido oxidados, colectivamente variantes de oxo. Ejemplos de residuos oxidados incluyen, pero no se limitan a, uno o más residuos de histidina y/o triptofano. Otros residuos oxidados también se han detectado usando LC-MS y se describen abajo tal como metionina oxidada. La cromatografía subsecuente tal como AEX puede ser usada para aislar estas variantes de oxo a partir de la proteína de interés en una muestra dada y se describe en la presente.

En un aspecto, las variantes pueden incluir oxidación de uno o más residuos de triptofano para formar N-formilcinureninas. En un aspecto adicional, las variantes pueden incluir oxidación de uno o más residuos de triptofano para formar mono-hidroxil triptofano. En un aspecto particular, las variantes de proteína pueden incluir oxidación de uno o más residuos de triptofano para formar di-hidroxil triptofano. En un aspecto particular, las variantes de proteína pueden incluir oxidación de uno o más residuos de triptofano para formar tri-hidroxil triptofano.

En otro aspecto, las variantes de oxo pueden incluir una o más modificaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en: desamidación de uno o más residuos de asparagina; uno o más ácidos aspárticos convertidos a iso-aspartato y/o asparagina; oxidación de uno o más residuos de metionina; oxidación de uno o más residuos de triptofano para formar N-formilcinurenina; oxidación de uno o más residuos de triptofano para formar mono-hidroxil triptofano; oxidación de uno o más residuos de triptofano para formar di-hidroxil triptofano; oxidación de uno o más residuos de triptofano para formar tri-hidroxil triptofano; 3-desoxiglucosonación de Arg de uno o más residuos de arginina; remoción de glicina C-terminal; y presencia de uno o más glicositos no glicosilados.

En una modalidad, el método para manufacturar una proteína de MiniTrampa comprende (a)

capturar una proteína de fusión de aflibercept de longitud completa en una primera plataforma cromatográfica y (b) escindir el aflibercept formando de este modo una proteína de MiniTrampa, *es decir,* aflibercept ausente de su dominio Fc. En un aspecto, el primer soporte cromatográfico comprende un medio de cromatografía de afinidad, un medio de cromatografía de intercambio iónico, o un medio de cromatografía de interacción hidrofóbica. En un aspecto particular, la primera plataforma cromatográfica comprende una plataforma de cromatografía de afinidad tal como una Proteína A. En un aspecto adicional, la proteína de la etapa de captura (a) se eluye a partir de la primera plataforma de cromatografía previo a la etapa de escisión (b). En todavía un aspecto adicional, una segunda etapa de captura sigue a la etapa de escisión (b). En un aspecto particular, esta segunda etapa de captura puede ser facilitada por cromatografía de afinidad tal como cromatografía de afinidad de Proteína A. El flujo continuo de esta segunda etapa de captura (que comprende MiniTrampa) tiene un primer color, por ejemplo, un color amarillo-marrón y medida que tiene un valor BY y/o b* particular – *véase, por ejemplo,* Ejemplo 9 abajo. Adicionalmente, el análisis de LC-MS de este segundo flujo continuo de captura puede demostrar la presencia de variantes de oxo en donde uno o más residuos de MiniTrampa son oxidadas (*véase* Ejemplo 9 bajo).

En un aspecto adicional, el segundo flujo continuo de captura puede ser sometido a cromatografía de intercambio iónico tal como AEX. Esta columna de AEX puede ser lavada usando un amortiguador adecuado y una fracción de flujo continuo de AEX puede ser recolectada que comprende esencialmente MiniTrampa. Esta fracción de flujo continuo de AEX puede tener un segundo color que es de un color amarillo-marrón que tiene un valor BY y/o b* particular. En un aspecto adicional, el primer color (flujo continuo a partir de la segunda etapa de captura) y segundo color (flujo continuo del procedimiento de intercambio iónico) tienen diferentes colores como se mide ya sea por el sistema BY y/o b*. En un aspecto, el segundo color demuestra un color amarillo-marrón disminuido cuando se compara con el primer color usando ya sea un valor BY y/o b* después de AEX.

En otra modalidad, la actividad de escisión de la etapa (b) puede ser realizada usando una columna cromatográfica en donde la actividad de escisión, por ejemplo, una actividad enzimática, se fija o inmoviliza a una matriz de columna. La columna usada en la etapa (b) puede comprender una o más de las proteasas ya aludidas a y más completamente descritas abajo.

En una modalidad, el procedimiento de cromatografía de intercambio iónico puede comprender un medio de cromatografía de intercambio aniónico (AEX). En otro aspecto, el medio de cromatografía de intercambio iónico comprende un medio de cromatografía de intercambio catiónico (CEX). Condiciones adecuadas para emplear AEX incluyen, pero no se limitan a, clorhidrato de Tris a un pH de aproximadamente 8.3 hasta aproximadamente 8.6. Después del equilibrio usando, por

ejemplo, clorhidrato de Tris a un pH de aproximadamente 8.3 hasta aproximadamente 8.6, la columna de AEX se carga con la muestra. Después de cargar la columna, la columna puede ser lavada una o múltiples veces usando, por ejemplo, el amortiguador de equilibrio. En un aspecto particular, las condiciones usadas pueden facilitar el comportamiento cromatográfico diferencial de MiniTrampa y sus variantes oxo usando AEX de manera que la MiniTrampa está sustancialmente en la fracción de flujo continuo mientras las variantes de oxo son sustancialmente retenidas en la columna de AEX y pueden ser recolectadas extrayendo la columna (*véase* Ejemplo 9 bajo).

En un ejemplo, muestras de diferentes etapas de producción se analizaron por color y presencia de variantes de oxo. Con referencia al Ejemplo 9, la combinación de flujo completo de afinidad (flujo continuo a partir de una segunda etapa de afinidad de Proteína A) tiene un primer valor b* de aproximadamente 1.58 (*véase* **Tabla 9-3**). Este segundo flujo continuo de afinidad se sometió a AEX. El flujo continuo de AEX tiene un segundo valor b* de aproximadamente 0.50, indicando una reducción significante en el color amarillo-marrón después del uso de AEX. La extracción de la columna de AEX proporciona una muestra extraída y se observó un tercer valor b* de aproximadamente 6.10, indicando que esta muestra de extracción tenía un color más amarillo-marrón cuando se compara con ya sea la carga o flujo continuo.

Con referencia nuevamente al Ejemplo 9, también se realizó el análisis de variante de oxo. Las muestras analizadas donde la combinación de flujo completo de afinidad (segunda elución de afinidad de Proteína A), flujo continuo de AEX, y extracción de AEX. Con referencia a la **Tabla 9-5** y **Tabla 9-6**, los cambios en las variantes de oxo pueden ser observados entre las diferentes etapas de producción. Por ejemplo, este cambio puede ser ilustrado por los datos en la sección del “Nivel de Oxidación de Triptofano (%)”, específicamente, la columna “W58(+16)”. Se puede observar que las variantes de oxo (específicamente, oxo-triptofano) van desde aproximadamente 0.055% en una muestra de carga hasta aproximadamente 0.038% en una muestra de flujo continuo después de la cromatografía de AEX, que indica que existe una reducción en las variantes oxo después de AEX. Se analizó la extracción de AEX y el porcentaje de las especies de oxo-triptofano se encontró por ser aproximadamente 0.089%. Cuando este valor de extracción se comparó con la carga (así como también el flujo continuo), parece que una porción significante de esta variante oxo se retiene en la columna de AEX.

La presente modalidad puede incluir la adición de una o más etapas, en ningún orden particular, tal como cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía multimodal, inactivación viral (*por ejemplo,* usando pH bajo), filtración viral, y/o ultra/diafiltración.

Una modalidad de la presente invención se dirige a un método para regenerar una columna de cromatografía que comprende una resina. En un aspecto de la modalidad, la resina tiene un agente

hidrolizante inmovilizado. En aún otro aspecto de la modalidad, la resina comprende una enzima proteasa inmovilizada. En todavía otro aspecto de la modalidad, la resina es una resina FabRICATOR® o un mutante de la resina. En un aspecto de la modalidad, el método para regenerar una columna que comprende una resina mejora la eficiencia de reacción de la resina.

En un aspecto de la modalidad, un método para regenerar una columna que comprende una resina incluye incubar la resina de la columna con ácido acético. En un aspecto, la concentración de ácido acético usado es desde aproximadamente 0.1 M hasta aproximadamente 2 M. En un aspecto, la concentración de ácido acético es aproximadamente 0.5 M. En un aspecto, la resina es incubada por al menos aproximadamente 10 minutos. En otro aspecto, la resina es incubada por al menos aproximadamente 30 minutos. En aún otro aspecto de esta modalidad, la resina es incubada por al menos aproximadamente 50 minutos. En aún otro aspecto de esta modalidad, la resina es incubada por al menos aproximadamente 100 minutos. En aún otro aspecto de esta modalidad, la resina es incubada por al menos aproximadamente 200 minutos. En aún otro aspecto de esta modalidad, la resina es incubada por al menos aproximadamente 300 minutos.

Opcionalmente, la resina de la columna es además incubada con clorhidrato de guanidina (Gu-HCl). En un aspecto, ácido acético ausente de Gu–HCl se usa para regenerar la resina de la columna. La concentración de Gu-HCl empleada es desde aproximadamente 1 N hasta aproximadamente 10 N. En otro aspecto, la concentración de Gu-HCl es aproximadamente 6 N. En un aspecto adicional, la resina de la columna puede ser incubada por al menos aproximadamente 10 minutos con los agentes regenerativos (ácido acético, Gu-HCl). En aún otro aspecto, la resina es incubada por al menos aproximadamente 30 minutos. En todavía otro aspecto, la resina es incubada por al menos aproximadamente 50 minutos. En aún otro aspecto, tal resina es incubada por al menos aproximadamente 100 minutos.

En una modalidad, la columna que comprende una resina es almacenada en etanol. En un aspecto, la columna es almacenada en etanol, en donde el porcentaje de etanol es desde aproximadamente 5% en v/v hasta aproximadamente 20% en v/v. En un aspecto particular, la columna es almacenada usando 20% en v/v etanol.

En una modalidad, el proceso puede comprender, además, formular la MiniTrampa del VEGF usando un excipiente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, el excipiente farmacéuticamente aceptable se puede seleccionar a partir de los siguientes: agua, agentes amortiguadores, azúcar, sal, tensoactivo, aminoácido, poliol, agente quelante, emulsificador y preservativo. Otros excipientes bien conocidos para los expertos en la técnica están dentro del punto de vista de esta modalidad.

La formulación de la presente invención es adecuada para administración a un sujeto humano. En un aspecto de la presente modalidad, la administración puede ser efectuada por inyección

intravítrea. En un aspecto, la formulación puede tener aproximadamente 40 hasta aproximadamente 200 mg/mL de la proteína de interés. En un aspecto particular, la proteína de interés es ya sea aflibercept o MiniTrampa de aflibercept.

La formulación puede ser usada en un método para tratar o prevenir trastornos oculares angiogénicos el cual puede incluir: degeneración macular relacionada con la edad (*por ejemplo,* húmeda o seca), edema macular, edema macular después de la oclusión de la vena retinal, oclusión de la vena retinal (RVO), oclusión de la vena retinal central (CRVO), oclusión de la vena retinal central ramificada (BRVO), edema macular diabético (DME), neovascularización coroidal (CNV), neovascularización del iris, glaucoma neovascular, fibrosis post-quirúrgica en glaucoma, vitreoretinopatía proliferativa (PVR), neovascularización del disco óptico, neovascularización corneal, neovascularización retinal, neovascularización vítreal, pannus, ptergio, retinopatía vascular, retinopatía diabética en un sujeto con edema macular diabético; o retinopatías diabéticas (*por ejemplo,* retinopatía diabética no proliferativa (*por ejemplo,* caracterizada por un nivel de Escala de Severidad de Retinopatía Diabética (DRSS) de aproximadamente 47 o 53) o retinopatía diabética proliferativa; *por ejemplo,* en un sujeto que no sufre de DME).

Variantes de IdeS

La presente descripción describe el uso de IdeS (FabRICATOR) (SEQ ID NO.: 1) u otros polipéptidos los cuales son variantes de IdeS (SEQ ID NO.: 2 a 16) para producir una MiniTrampa del VEGF. IdeS (SEQ ID NO.: 1) incluye residuos de asparagina en la posición 87, 130, 182 y/o 274 (mostrada como "***N****" negrita y en cursivas de la SEQ ID NO.: 1 bajo). La asparagina en estas posiciones puede ser mutada a un aminoácido distinto de asparagina para formar variantes de IdeS (y el(los) aminoácido(s) mutado(s) se muestran como cursivas y aminoácido(s) no subrayado(s):

SEQ ID NO.: 1

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTF***N********GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N***
*****GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***N********GYRLSLTNHGPTP
VKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINH
VINLWGADFDS***N********GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLS
TGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 2

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N********
GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***N********GYRLSLTNHGPTPV

KEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVI
NLWGADFDS***N****GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLST
GQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 3

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTF***N****GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***
GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***N****GYRLSLTNHGPTPV
KEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVI
NLWGADFDS***N****GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLST
GQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 4

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTF***N****GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N***
*******GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTPV
KEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVI
NLWGADFDS***N****GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLST
GQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 5

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTFN*GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFN
*GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFIN*GYRLSLTNHGPTP
VKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINH
VINLWGADFDSDGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLS
TGQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 6

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTFDGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFR
GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFIN*GYRLSLTNHGPTPV
KEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVI
NLWGADFDSN*GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLST
GQDSWNQTN

SEQ ID NO.: 7

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N****

GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTPVK
EGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVIN
LWGADFDS***N****GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTG
QDSWNQTN

SEQ ID NO.: 8

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N****
GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***N****GYRLSLTNHGPTPV
KEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVI
NLWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTG
QDSWNQTN

SEQ ID NO.: 9

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTF***N****GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***
GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTPVK
EGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVIN
LWGADFDS***N****GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTG
QDSWNQTN

SEQ ID NO.: 10

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTF***N****GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***
GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***N****GYRLSLTNHGPTPV
KEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVI
NLWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTG
QDSWNQTN

SEQ ID NO.: 11

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTF***N****GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N***
*******GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTPV
KEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVI
NLWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTG
QDSWNQTN

SEQ ID NO.: 12

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE

DVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***
GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTPVK
EGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVIN
LWGADFDS***N****GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTG
QDSWNQTN

SEQ ID NO.: 13

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***
GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***N****GYRLSLTNHGPTPV
KEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVI
NLWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTG
QDSWNQTN

SEQ ID NO.: 14

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***N****
GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTPVK
EGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVIN
LWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQ
DSWNQTN

SEQ ID NO.: 15

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTF***N****GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***
GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTPVK
EGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVIN
LWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQ
DSWNQTN

SEQ ID NO.: 16

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGE
DVFHAPYVANQGWYDITKTF***D***GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINF***R***
GEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFI***L***GYRLSLTNHGPTPVK
EGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVIN
LWGADFDS***D***GNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQ
DSWNQTN

En una modalidad, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácido aislado que comprende al menos 70% de identidad de secuencia sobre una longitud completa de una secuencia de aminoácido aislado como se expone en el grupo que consiste en la SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15 y SEQ ID NO.: 16. En un aspecto, la secuencia de aminoácido aislado tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia sobre una longitud completa de la secuencia de aminoácido aislado. En otro aspecto, la secuencia de aminoácido aislado tiene al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia sobre una longitud completa de la secuencia de aminoácido aislado. En otro aspecto, la secuencia de aminoácido aislado tiene aproximadamente 100% de identidad de secuencia sobre una longitud completa de la secuencia de aminoácido aislado. En un aspecto, el polipéptido puede ser capaz de escindir una proteína objetivo en fragmentos. En un aspecto particular, la proteína objetivo es una IgG. En otro aspecto, la proteína objetivo es una proteína de fusión. En aún otro aspecto, los fragmentos pueden comprender un fragmento Fab y/o un fragmento Fc.

La presente descripción también incluye una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido aislado que comprende al menos 70% de identidad de secuencia sobre una longitud completa de la secuencia de aminoácido aislado como se expone en el grupo que consiste en la SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15 y SEQ ID NO.: 16. En un aspecto, la secuencia de aminoácido aislado tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia sobre una longitud completa de la secuencia de aminoácido aislado. En otro aspecto, la secuencia de aminoácido aislado tiene al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia sobre una longitud completa de la secuencia de aminoácido aislado. En otro aspecto, la secuencia de aminoácido aislado tiene aproximadamente 100% de identidad de secuencia sobre una longitud completa de la secuencia de aminoácido aislado. En un aspecto, el polipéptido puede ser capaz de escindir una proteína objetivo en fragmentos. En un aspecto particular, la proteína objetivo es una IgG. En otro aspecto particular, la proteína objetivo es una proteína de fusión. En aún otro aspecto particular, los fragmentos pueden comprender un fragmento Fab y/o un fragmento Fc.

La presente descripción también incluye un vector el cual comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido aislado que comprende al menos 70% de identidad de secuencia sobre una longitud completa de la secuencia de aminoácido aislado como se expone en el grupo que consiste en la SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 4, SEQ ID

NO.: 5, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15 y SEQ ID NO.: 16. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico está operativamente ligada a una secuencia de control de expresión capaz de dirigir su expresión en una célula hospedera. En un aspecto, el vector puede ser un plásmido. En un aspecto, la secuencia de aminoácido aislado tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia sobre una longitud completa de la secuencia de aminoácido aislado. En otro aspecto, la secuencia de aminoácido aislado tiene al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia sobre una longitud completa de la secuencia de aminoácido aislado. En otro aspecto, la secuencia de aminoácido aislado tiene aproximadamente 100% de identidad de secuencia sobre una longitud completa de la secuencia de aminoácido aislado. En un aspecto, el polipéptido puede ser capaz de escindir una proteína objetivo en fragmentos. En un aspecto particular, la proteína objetivo es una IgG. En otro aspecto, la proteína objetivo es una proteína de fusión. En aún otro aspecto, los fragmentos pueden comprender un fragmento Fab y/o un fragmento Fc.

En una modalidad, el aminoácido aislado puede comprender una secuencia de aminoácido parenteral definida por la SEQ ID NO.: 1 con un residuo de asparagina en la posición 87, 130, 182 y/o 274 mutado a un aminoácido distinto de asparagina. En un aspecto, la mutación puede conferir una estabilidad química incrementada a valores de pH alcalinos comparados con la secuencia de aminoácido parenteral. En otro aspecto, la mutación puede conferir un incremento en la estabilidad química por 50% a valores de pH alcalinos comparados con la secuencia de aminoácido parenteral. En un aspecto, el aminoácido puede ser seleccionado a partir de ácido aspártico, leucina, y arginina. En un aspecto particular, el residuo de asparagina en la posición 87 es mutado a un residuo de ácido aspártico. En otro aspecto, el residuo de asparagina en la posición 130 es mutado a un residuo de arginina. En aún otro aspecto, el residuo de asparagina en la posición 182 es mutado a un residuo de lisina. En aún otro aspecto, el residuo de asparagina en la posición 274 es mutado a yb residuo de ácido aspártico. En aún otro aspecto, los residuos de asparagina en las posiciones 87 y 130 son mutados. En aún otro aspecto, los residuos de asparagina en las posiciones 87 y 182 son mutados. En aún otro aspecto, los residuos de asparagina en las posiciones 87 y 274 son mutados. En aún otro aspecto, los residuos de asparagina en las posiciones 130 y 182 son mutados. En aún otro aspecto, los residuos de asparagina en las posiciones 130 y 274 son mutados. En aún otro aspecto, los residuos de asparagina en las posiciones 182 y 274 son mutados. En aún otro aspecto, los residuos de asparagina en las posiciones 87, 130 y 182 son mutados. En aún otro aspecto, los residuos de asparagina en las posiciones 87, 182 y 274 son mutados. En aún otro aspecto, los residuos de asparagina en las posiciones 130, 182 y 274 son mutados. En aún otro aspecto, los

residuos de asparagina en las posiciones 87, 130, 182 y 274 son mutados.

En una modalidad relacionada, la descripción incluye una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido aislado que comprende una secuencia de aminoácido parenteral definida por la SEQ ID NO.: 1 con residuos de asparagina en las posiciones 87, 130, 182 y/o 274 mutados a un aminoácido distinto de asparagina – véase anteriormente. La mutación puede conferir una estabilidad química incrementada a valores de pH alcalinos comparados con la secuencia de aminoácido parenteral.

En una modalidad relacionada adicional, la descripción incluye un vector, el cual comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido aislado que comprende una secuencia de aminoácido parenteral definida por la SEQ ID NO.: 1 con un residuo de asparagina en la posición 87, 130, 182 y/o 274 mutado a un aminoácido distinto de asparagina – véase anteriormente. La mutación puede conferir una estabilidad química incrementada a valores de pH alcalinos comparados con la secuencia de aminoácido parenteral. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico está operativamente ligada a una secuencia de control de expresión capaz de dirigir su expresión en una célula hospedera. En un aspecto, el vector puede ser un plásmido.

Producción a Base de Afinidad

La presente descripción también proporciona métodos para reducir proteínas de célula hospedera, así como también otras proteínas indeseables y ácidos nucleicos durante la producción de una proteína anti-VEGF usando cromatografía de afinidad.

En una modalidad, un método para producir una proteína recombinante comprende: (a) proporcionar una célula hospedera diseñada por ingeniería genética para expresar una proteína recombinante de interés; (b) cultivar la célula hospedera bajo condiciones adecuadas en las cuales la célula expresa la proteína recombinante de interés; y (c) recolectar una preparación de la proteína recombinante de interés producida por la célula. En un aspecto, la proteína recombinante de interés es una proteína anti-VEGF. En un aspecto particular, la proteína anti-VEGF se selecciona a partir del grupo que consiste en aflibercept, MiniTrampa, MiniTrampa recombinante (un ejemplo del cual se describe en la Patente Estadounidense No. 7,279,159), un scFv y otras proteínas anti-VEGF.

En un aspecto de la presente modalidad, la proteína recombinante de interés es expresada en una célula hospedera adecuada. Ejemplos no limitantes de células hospederas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, CHO, CHO K1, EESYR®, NICE®, NS0, Sp2/0, células renales embriónicas y BHK.

En un aspecto de la presente modalidad, la proteína recombinante de interés es cultivada en un CDM. Un CDM adecuado incluye medio Eagle Modificado de Dulbecco (DME), Mezcla Nutriente de Ham, medio Excell, medio IS CHO-CD, y CDM1B. Otros CDMs conocidos por aquellos expertos en

la técnica están también contemplados por estar dentro del alcance de la presente invención.

La preparación de producción puede comprender al menos un contaminante que incluye una o más proteínas de célula hospedera además de la proteína recombinante de interés. Al menos un contaminante puede ser derivado a partir de sustrato celular, cultivo celular o un proceso en dirección descendente.

En una modalidad, la invención se dirige a métodos para producir una proteína anti-VEGF a partir de una muestra biológica usando cromatografía de afinidad. En un aspecto particular, los métodos descritos en la presente pueden ser usados para separar, al menos en parte, la proteína anti-VEGF de una o más proteínas de célula hospedera y ácidos nucleicos (*por ejemplo,* ADN) formados durante el proceso de producción de cultivo de una proteína anti-VEGF.

En un aspecto, el método puede comprender someter una muestra biológica que comprende la proteína anti-VEGF junto con los contaminantes acompañantes a una cromatografía de afinidad bajo condiciones adecuadas. En un aspecto particular, la cromatografía de afinidad puede comprender material capaz de selectivamente o específicamente unirse a la proteína anti-VEGF ("captura"). Ejemplos no limitantes de tal material cromatográfico incluyen: Proteína A, Proteína G, material cromatográfico que comprende, por ejemplo, Proteína capaz de unirse a la proteína anti-VEGF, y material cromatográfico que comprende una proteína de unión a Fc. En un aspecto específico, la proteína capaz de unirse a, o interactuar con la proteína anti-VEGF puede ser un anticuerpo, proteína de fusión o un fragmento de la misma. Ejemplos no limitantes de tal material capaz de selectivamente o específicamente unirse a la proteína anti-VEGF se describen en el Ejemplo 7.

En un aspecto de la presente modalidad, el método puede comprender someter una muestra biológica que comprende una proteína anti-VEGF y una o más proteínas de célula hospedera/contaminantes a cromatografía de afinidad bajo condiciones adecuadas, en donde la fase estacionaria de cromatografía de afinidad comprende una proteína capaz de selectivamente o específicamente unirse a la proteína anti-VEGF. En un aspecto particular, la proteína puede ser un anticuerpo, una proteína de fusión, un scFv o un fragmento de anticuerpo. En un aspecto específico, la proteína puede ser formas de $VEGF_{165}$, $VEGF_{121}$, o VEGF de otras especies, tal como, conejo. Por ejemplo, como se ejemplifica en la **Tabla 7-1 y Tabla 7-10**, usando $VEGF_{165}$ como la proteína capaz de selectivamente o específicamente unirse a, o interactuar con la proteína anti-VEGF conduce a una producción exitosa de MT5 (una proteína anti-VEGF), aflibercept y un fragmento scFv anti-VEGF. En otro aspecto específico, la proteína puede ser una o más de las proteínas que tienen una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO.: 73-80. La **Tabla 7-1** también describe producción exitosa de MT5 usando las proteínas que tienen secuencias de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO.: 73-80 como la proteína capaz de selectivamente o

específicamente unirse a la proteína anti-VEGF (MT5).

En un aspecto de la presente modalidad, el método puede comprender someter una muestra biológica que comprende la proteína anti-VEGF y una o más proteínas de célula hospedera/contaminantes a cromatografía de afinidad bajo condiciones adecuadas, en donde la fase estacionaria de cromatografía de afinidad comprende una proteína capaz de selectivamente o específicamente unirse a, o interactuar con la proteína anti-VEGF, en donde la proteína anti-VEGF puede ser seleccionada a partir de aflibercept, MiniTrampa del VEGF, o un anticuerpo anti-VEGF. En un aspecto particular, la MiniTrampa del VEGF se puede obtener a partir de componentes del receptor VEGF; adicionalmente, se puede formar por expresión recombinante de la MiniTrampa del VEGF en una célula hospedera. Realizar el método puede reducir la cantidad de una o más proteínas de célula hospedera en la muestra. Por ejemplo, la **Figura 35A** y **Figura 35B** muestran una reducción significante en proteínas de célula hospedera totales en la muestra que comprende MT5 (una proteína anti-VEGF) usando cinco columnas de cromatografía de afinidad diferentes que comprenden (i) $VEGF_{165}$ (SEQ ID NO.: 72); (ii) mAb1 (una IgG1 humana de mAb anti-VEGFR1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 73 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 74 es una cadena ligera); (iii) mAb2 (una IgG1 humana de mAb anti-VEGFR1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 75 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 76 es una cadena ligera); (iv) mAb3 (una IgG1 de ratón mAb anti-VEGFR1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 77 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 78 es una cadena ligera) y (v) mAb4 (una IgG1 de ratón mAb anti-VEGFR1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 79 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 80 es una cadena ligera) como diferentes proteínas capaz de selectivamente o específicamente unirse a MT5. Como se observa en la **Figura 35A** y **Figura 35B**, las eluciones a partir de cada uno de los procesos de producción a base de afinidad reducen las proteínas de la célula hospedera desde arriba de 7000 ppm hasta aproximadamente 25 ppm, y hasta aproximadamente 55 ppm respectivamente.

Condiciones adecuadas para emplear cromatografía de afinidad pueden incluir, pero no se limitan a, equilibrio de una columna de cromatografía de afinidad usando un amortiguador de equilibrio. Después del equilibrio usando, por ejemplo, clorhidrato de Tris a un pH de aproximadamente 8.3 hasta aproximadamente 8.6, la columna de cromatografía de afinidad se carga con una muestra biológica. Después de cargar la columna, la columna puede ser lavada una o múltiples veces usando, por ejemplo, el amortiguador de equilibrio tal como Salina Amortiguada de Fosfato Dulbecco (DPBS). Otros lavados que incluyen lavados que emplean diferentes amortiguadores pueden ser usados antes de eluir la columna. La elución de columna puede ser afectada por el tipo de amortiguador y pH y conductividad. Otras condiciones de elución bien conocidas por aquellos expertos en la técnica pueden ser aplicadas. Después de la elución usando uno o más tipos de

amortiguadores de elución, por ejemplo, glicina a un pH de aproximadamente 2.0 hasta aproximadamente 3.0, las fracciones eluidas pueden ser neutralizadas con la adición de un amortiguador neutralizante, por ejemplo, 1 M Tris a pH 7.5.

En un aspecto de la modalidad, el pH de tanto el amortiguador de lavado como equilibrio puede ser desde aproximadamente 7.0 hasta aproximadamente 8.6. En un aspecto de la modalidad, el amortiguador de lavado puede ser DPBS. En un aspecto, el amortiguador de elución puede comprender 100 mM de amortiguador de glicina con pH de aproximadamente 2.5. En otro aspecto, el amortiguador de elución puede ser un amortiguador con un pH de aproximadamente 2.0 hasta aproximadamente 3.0. En un aspecto, el amortiguador neutralizante puede comprender 1 M de tris con pH de aproximadamente 7.5.

En un aspecto de la presente modalidad, el método puede comprender, además, lavar la columna con un amortiguador de lavado. En un aspecto de la presente modalidad, el método puede comprender, además, eluir la columna con un amortiguador de elución para obtener fracciones de elución. En un aspecto particular, la cantidad de proteínas de célula hospedera en las fracciones eluidas es significantemente reducida comparado con la cantidad de proteínas de célula hospedera en la muestra biológica, por ejemplo, por aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99%.

La presente modalidad puede incluir la adición de una o más etapas, en ningún orden particular, tal como cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía a base de afinidad, cromatografía multimodal, inactivación viral (*por ejemplo,* usando pH bajo), filtración viral, y/o ultra/diafiltración.

En un aspecto, el perfil de glicosilación de una composición de una proteína anti-VEGF es como sigue: aproximadamente 40% hasta aproximadamente 50% de glicanos fucosilados totales, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 55% de glicanos sialilados totales, aproximadamente 6% hasta aproximadamente 15% de manosa-5, y aproximadamente 60% hasta aproximadamente 79% de glicanos galactosilados.

En un aspecto de esta modalidad, la proteína anti-VEGF tiene glicosilación de Man5 a aproximadamente 32.4% de 123 residuos de asparagina y/o aproximadamente 27.1% de 196 residuos de asparagina. En una modalidad específica, la proteína anti-VEGF puede ser aflibercept, anticuerpo anti-VEGF o MiniTrampa del VEGF.

En una modalidad, el método puede comprender, además, formular una sustancia de fármaco usando un excipiente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, el excipiente farmacéuticamente aceptable se puede seleccionar a partir de los siguientes: agua, agentes amortiguadores, azúcar, sal, tensoactivo, aminoácido, poliol, agente quelante, emulsificador y preservativo. Otros excipientes bien conocidos para los expertos en la técnica están dentro del punto de vista de esta modalidad.

En un aspecto de la modalidad, la formulación puede ser adecuada para administración a un sujeto humano. En un aspecto de la presente modalidad, la administración puede ser efectuada por inyección intravítrea. En un aspecto, la formulación puede tener aproximadamente 40 hasta aproximadamente 200 mg/mL de la proteína de interés. En un aspecto particular, la proteína de interés puede ser aflibercept, anticuerpo anti-VEGF o MiniTrampa del VEGF.

La formulación puede ser usada en un método para tratar o prevenir trastornos oculares angiogénicos el cual puede incluir: degeneración macular relacionada con la edad (*por ejemplo,* húmeda o seca), edema macular, edema macular después de la oclusión de la vena retinal, oclusión de la vena retinal (RVO), oclusión de la vena retinal central (CRVO), oclusión de la vena retinal central ramificada (BRVO), edema macular diabético (DME), neovascularización coroidal (CNV), neovascularización del iris, glaucoma neovascular, fibrosis post-quirúrgica en glaucoma, vitreoretinopatía proliferativa (PVR), neovascularización del disco óptico, neovascularización corneal, neovascularización retinal, neovascularización vítreal, pannus, ptergio, retinopatía vascular, retinopatía diabética en un sujeto con edema macular diabético; o retinopatías diabéticas (*por ejemplo,* retinopatía diabética no proliferativa (*por ejemplo,* caracterizada por un nivel de Escala de Severidad de Retinopatía Diabética (DRSS) de aproximadamente 47 o 53) o retinopatía diabética proliferativa; *por ejemplo,* en un sujeto que no sufre de DME).

Síntesis de Especies Oxo

Una modalidad de la presente invención se dirige a uno o más métodos para sintetizar especies de proteína oxidada usando luz. En un aspecto de la presente modalidad, la proteína de interés es una proteína anti-VEGF. En un aspecto particular, la proteína anti-VEGF es aflibercept. En otro aspecto, la proteína anti-VEGF es una MiniTrampa del VEGF que incluye MiniTrampa del VEGF recombinante. En aún otro aspecto de la presente modalidad, la proteína anti-VEGF es un fragmento variable de cadena única (scFv).

En un aspecto de la presente modalidad, una muestra comprende una proteína de interés, por ejemplo, proteína de fusión aflibercept con mínima o ninguna de las variantes de oxo. La muestra es foto-estresada para sintetizar especies oxidadas de aflibercept. En un aspecto particular, la muestra es foto-estresada usando luz fría-blanca. En otro aspecto particular, la muestra es foto-estresada usando luz ultravioleta.

En un aspecto específico de la modalidad, una muestra que comprende aflibercept u otra proteína anti-VEGF es expuesta a luz fría-blanca por aproximadamente 30 horas hasta aproximadamente 300 horas resultando en aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 50-veces de incremento en el oligopéptido modificado. Estos péptidos son enzimáticamente digeridos y analizados comprendiendo uno o más a partir del grupo que consiste en:

DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17), EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18), QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19), TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20), TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21), SDTGRPFVEMYSEIPEIIH*MTEGR (SEQ ID NO.: 22), VH*EKDK (SEQ ID NO.: 23), SDTGRPFVEM*YSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 64), SDTGRPFVEMYSEIPEIIHM*TEGR (SEQ ID NO.: 65), TQSGSEM*K (SEQ ID NO.: 66), SDQGLYTC*AASSGLM*TK (SEQ ID NO.: 67), IIW*DSR (SEQ ID NO.: 28), RIIW*DSR (SEQ ID NO.: 115), IIW*DSRK (SEQ ID NO.: 114), TELNVGIDFNW*EYPSSK (SEQ ID NO.: 29), GFIISNATY*K (SEQ ID NO.: 69), KF*PLDTLIPDGK (SEQ ID NO.: 70) F*LSTLTIDGVTR (SEQ ID NO.: 32), en donde H* es una histidina que es oxidada a 2-oxo-histidina, en donde C* es una cisteína que es carboximetilada, en donde M* es una metionina oxidada, en donde W* es un triptofano oxidado, en donde Y* es una tirosina oxidada, y en donde F* es una fenilalanina oxidada. La digestión puede ser realizada por proteasas aludidas como antes, por ejemplo, tripsina. Los oligopéptidos pueden ser analizados usando espectrometría de masas.

En un aspecto específico de la modalidad, una muestra que comprende aflibercept u otra proteína anti-VEGF es expuesta a luz ultravioleta por aproximadamente 4 horas hasta aproximadamente 40 horas resultando en aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 25-veces de incremento en los productos de oligopéptido modificado (obtenidos realizando digestión) en donde la muestra comprende uno o más oligopéptidos modificados seleccionados a partir del grupo que consiste en: DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17), EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18), QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19), TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20), TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21), SDTGRPFVEMYSEIPEIIH*MTEGR (SEQ ID NO.: 22), VH*EKDK (SEQ ID NO.: 23), SDTGRPFVEM*YSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 64), SDTGRPFVEMYSEIPEIIHM*TEGR (SEQ ID NO.: 65), TQSGSEM*K (SEQ ID NO.: 66), SDQGLYTC*AASSGLM*TK (SEQ ID NO.: 67), IIW*DSR (SEQ ID NO.: 28), RIIW*DSR (SEQ ID NO.: 115), IIW*DSRK (SEQ ID NO.: 114), TELNVGIDFNW*EYPSSK (SEQ ID NO.: 29), GFIISNATY*K (SEQ ID NO.: 69), KF*PLDTLIPDGK (SEQ ID NO.: 70) F*LSTLTIDGVTR (SEQ ID NO.: 32), en donde H* es una histidina que es oxidada a 2-oxo-histidina, en donde C* es una cisteína que es carboximetilada, en donde M* es una metionina oxidada, en donde W* es un triptofano oxidado, en donde Y* es una tirosina oxidada, y en donde F* es una fenilalanina oxidada. La digestión puede ser realizada por proteasas aludidas como antes, por ejemplo, tripsina. Los oligopéptidos pueden ser analizados usando espectrometría de masas.

Métodos para Minimizar el Color Amarillo-Marrón

La presente descripción proporciona métodos para reducir la coloración amarillo-marrón durante la producción de aflibercept, MiniTrampa o similares producidos en un CDM.

En una modalidad, el método comprende cultivar una célula hospedera en un CDM bajo condiciones adecuadas, en donde la célula hospedera expresa una proteína recombinante de interés y después recolectar una preparación que comprende la proteína recombinante de interés. En un aspecto, la proteína recombinante de interés es una proteína anti-VEGF. En un aspecto particular, la proteína anti-VEGF se selecciona a partir del grupo que consiste en aflibercept, MiniTrampa, MiniTrampa recombinante (ejemplos de los cuales se describen en Patente Estadounidense No. 7,279,159, la cual se incorpora en la presente por referencia en su totalidad), un scFv y otras proteínas anti-VEGF. En un aspecto, el método puede producir una preparación de la proteína recombinante de interés, en donde el color de la preparación se caracteriza usando el método europeo BY o el método CIELAB (b*). Adicionalmente, la presencia de variantes de oxo puede ser analizada usando, por ejemplo, LC-MS.

En un aspecto de la presente modalidad, las condiciones de mitigación incluyen aumentar o disminuir las concentraciones acumulativas de uno o más componentes del medio, por ejemplo, aminoácidos, metales o antioxidantes, que incluyen, sales y precursores, que corresponden a una reducción en color y variantes de proteína de aflibercept y MiniTrampa del VEGF. Ejemplos no limitantes de aminoácidos incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, y valina. En un aspecto particular, la disminución de cisteína puede ser efectiva para reducir el color amarillo-marrón de una preparación. La concentración de cisteína también puede afectar las variantes de oxo.

En una modalidad, el método comprende cultivar una célula hospedera en un CDM bajo condiciones adecuadas, en donde la célula hospedera expresa una proteína recombinante de interés, tal como aflibercept, y recolectar una preparación de la proteína de interés producida por la célula, en donde se obtienen las condiciones adecuadas, en parte, reduciendo la concentración acumulativa de cisteína en el CDM a menos de, o igual a aproximadamente 10 mM. Ejemplos de medio adecuado incluyen, pero no se limitan a, CDM1B, Excell o similares. Como se usa en la presente, el término “cantidad acumulativa” se refiere a la cantidad total de un componente particular agregado a un biorreactor durante el curso del cultivo celular para formar el CDM, que incluye cantidades agregadas al comienzo del cultivo (CDM en el día 0) y cantidades subsecuentemente agregadas de los componentes. Cantidades de un componente agregado a un cultivo de tren de siembra o inóculo previo a la producción del biorreactor (*es decir,* previo al CDM en el día 0) también se incluyen cuando se calcula la cantidad acumulativa de los componentes. Una cantidad acumulativa es no afectada por la pérdida de un componente con el tiempo durante el cultivo (por ejemplo, a través del metabolismo o degradación química). De este modo, dos cultivos con las mismas cantidades

acumulativas de un componente pueden, no obstante, tener diferentes niveles absolutos, por ejemplo, si el componente se agrega a los dos cultivos a diferentes tiempos (*por ejemplo,* si en un cultivo todos los componentes se agregan al principio, y en otro cultivo el componente se agrega con el tiempo). Una cantidad acumulativa es también no afectada por síntesis *in situ* de un componente con el tiempo durante el cultivo (por ejemplo, mediante metabolismo o conversión química). De este modo, dos cultivos con las mismas cantidades acumulativas de un componente dado pueden, no obstante, tener diferentes niveles absolutos, por ejemplo, si el componente es sintetizado *in situ* en uno de los dos cultivos por medio de un proceso de bioconversión. Una cantidad acumulativa puede ser expresada en unidades tales como, por ejemplo, gramos o moles de los componentes.

Como se usa en la presente, el término “concentración acumulativa” se refiere a la cantidad acumulativa de un componente, dividida por el volumen del líquido en el biorreactor al comienzo del lote de producción, que incluye la contribución al volumen de partida a partir de cualquier inóculo usado en el cultivo. Por ejemplo, si un biorreactor contiene 2 litros de medio de cultivo celular al comienzo del lote de producción, y un gramo del componente X se agrega en los días 0, 1, 2, y 3, después la concentración acumulativa después del día 3 es 2 g/L (*es decir,* 4 gramos dividido por 2 litros). Sí, en el día 4, un adicional de un litro de líquido que no contiene el componente X se agregan al biorreactor, la concentración acumulativa podría permanecer 2 g/L. Sí, en el día 5, alguna cantidad de líquido se pierden a partir del biorreactor (por ejemplo, a través de la evaporación), la concentración acumulativa podría permanecer 2 g/L. Una concentración acumulativa puede ser expresada en unidades tales como, por ejemplo, gramos por litro o moles por litro.

En un aspecto de esta modalidad, el método comprende cultivar una célula hospedera en un CDM bajo condiciones adecuadas, en donde la célula hospedera expresa una proteína recombinante de interés, recolectar una preparación de la proteína producida por la célula, en donde se obtienen las condiciones adecuadas reduciendo la relación de concentración de cisteína acumulativa desde aproximadamente 1:10 hasta 1:29 a una concentración total acumulativa de aminoácido desde aproximadamente 1:50 hasta aproximadamente 1:30.

En una modalidad, el método comprende (i) cultivar una célula hospedera en un CDM bajo condiciones adecuadas, en donde la célula hospedera expresa una proteína recombinante de interés, tal como aflibercept, y (ii) recolectar una preparación de la proteína recombinante de interés producida por la célula, en donde se obtienen las condiciones adecuadas reduciendo la concentración acumulativa de hierro en el CDM a menos de aproximadamente 55.0 µM. En un aspecto de esta modalidad, la preparación obtenida por este método muestra un color amarillo-marrón menor que la preparación obtenida por un método en donde la concentración acumulativa

de hierro en el CDM es más de aproximadamente 55.0 µM.

En una modalidad, el método comprende cultivar una célula hospedera en un CDM bajo condiciones adecuadas, en donde la célula hospedera expresa una proteína recombinante de interés, tal como aflibercept. El método comprende, además, recolectar una preparación de la proteína recombinante de interés producida por la célula, en donde se obtienen las condiciones adecuadas reduciendo la concentración acumulativa de cobre en el CDM a menos de, o igual a aproximadamente 0.8 µM. En un aspecto de esta modalidad, la preparación obtenida por este método muestra un color amarillo-marrón menor que la preparación obtenida por un método en donde la concentración acumulativa de cobre en el CDM es más de aproximadamente 0.8 µM.

En una modalidad, el método comprende cultivar una célula hospedera en un CDM bajo condiciones adecuadas, en donde la célula hospedera expresa una proteína recombinante de interés, tal como aflibercept, y recolectar una preparación de la proteína recombinante de interés producida por la célula, en donde se obtienen las condiciones adecuadas reduciendo la concentración acumulativa de níquel en el CDM a menos de, o igual a aproximadamente 0.40 µM. En un aspecto de esta modalidad, la preparación obtenida por este método muestra un color amarillo-marrón menor que la preparación obtenida por un método en donde la concentración acumulativa de níquel en el CDM es más de aproximadamente 0.40 µM.

En una modalidad, el método comprende cultivar una célula hospedera en un CDM bajo condiciones adecuadas, en donde la célula hospedera expresa una proteína recombinante de interés, tal como aflibercept. El método comprende, además, recolectar una preparación de la proteína recombinante de interés producida por la célula, en donde se obtienen las condiciones adecuadas reduciendo la concentración acumulativa de zinc en el CDM a menos de, o igual a aproximadamente 56 µM. En un aspecto de esta modalidad, la preparación obtenida por este método muestra un color amarillo-marrón menor que la preparación obtenida por un método en donde la concentración acumulativa de zinc en el CDM es más de aproximadamente 56 µM.

En una modalidad, el método comprende cultivar una célula hospedera en un CDM bajo condiciones adecuadas, en donde la célula hospedera expresa una proteína recombinante de interés, tal como aflibercept. El método comprende, además, recolectar una preparación de la proteína recombinante de interés producida por la célula, en donde se obtienen las condiciones adecuadas por la presencia de antioxidantes en el CDM en una concentración acumulativa de aproximadamente 0.001 mM hasta aproximadamente 10 mM para un antioxidante único y no más de aproximadamente 30 mM de concentración acumulativa si múltiples antioxidantes se agregan en tal CDM. En un aspecto de esta modalidad, la preparación obtenida por este método muestra un color amarillo-marrón menor que la preparación obtenida por un método en donde los antioxidantes están presentes en el CDM en una

concentración acumulativa de menos de aproximadamente 0.01 mM o arriba de aproximadamente 100 mM. Ejemplos no limitantes del antioxidante pueden ser taurina, hipotaurina, glicina, ácido tióctico, glutationa, cloruro de colina, hidrocortisona, Vitamina C, Vitamina E, agentes quelantes, catalasa, S-carboximetil-L-cisteína, y combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitantes de agentes quelantes incluyen ácido aurintricarboxílico (ATA), deferoxamina (DFO), EDTA y citrato.

En una modalidad, el método comprende cultivar una célula hospedera en un CDM bajo condiciones adecuadas, en donde la célula hospedera expresa una proteína recombinante de interés, tal como aflibercept. El método comprende además, recolectar una preparación de la proteína recombinante de interés producida por la célula, en donde las condiciones adecuadas incluyen una CDM con una: concentración acumulativa de hierro en tal CDM que es menos de aproximadamente 55 µM, concentración acumulativa de cobre en tal CDM que es menos de o igual a aproximadamente 0.8 µM, concentración acumulativa de níquel en tal CDM que es menos de o igual a aproximadamente 0.40 µM, concentración acumulativa de zinc en tal CDM que es menos de o igual a aproximadamente 56 µM, concentración acumulativa de cisteína en tal CDM que es menos de 10 mM; y/o un antioxidante en tal CDM en una concentración de aproximadamente 0.001 mM hasta aproximadamente 10 mM para un antioxidante único, y no más de aproximadamente 30 mM de concentración acumulativa si múltiples antioxidantes se agregan en tal CDM.

En un aspecto de la presente modalidad, la preparación obtenida de usar condiciones adecuadas resulta en una reducción en variantes de proteína de aflibercept y MiniTrampa del VEGF a una cantidad deseada de variantes de proteína de aflibercept y MiniTrampa del VEGF (referido como “valor objetivo” de variantes de proteína de aflibercept y MiniTrampa del VEGF). En un aspecto adicional de esta modalidad, la preparación obtenida de usar condiciones adecuadas resulta en una reducción de color en las preparaciones a un valor b o valor BY deseado (referido como un “valor b* objetivo” “valor BY objetivo” respectivamente) cuando la preparación de la proteína, que incluye variantes de aflibercept y MiniTrampa del VEGF son normalizadas a una concentración de 5 g/L o 10 g/L. En un aspecto adicional de la presente modalidad, el valor b* objetivo (o valor BY objetivo) y/o valor objetivo de variantes se puede obtener en una preparación donde el titulador incrementa o no disminuye significantemente.

Estos y otros aspectos de la invención serán mejor apreciados y entendidos cuando se consideran en conjunto con la siguiente descripción y los dibujos acompañantes. La siguiente descripción, mientras indica varias modalidades y numerosos detalles específicos de la misma, se proporciona por medio de ilustración y no de limitación. Muchas sustituciones, modificaciones, adiciones, o reacomodos pueden hacerse dentro del alcance de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

El archivo de patente o solicitud contiene al menos una figura ejecutada en color. Las copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con figura(s) a color se proporcionarán por la Oficina a petición y pago de las tasas necesarias.

La Figura 1 representa una MiniTrampa del VEGF generado usando una modalidad ejemplar, que incluye VEGFR1 (SEQ ID NO.: 34), VEGFR2 (SEQ ID NO.: 36), fragmento de dominio de Bisagra (SEQ ID NO.: 60)) y el fragmento Fc escindido a partir de aflibercept (SEQ ID NO.: 113).

La Figura 2 representa un mecanismo propuesto para oxidación de histidina a 2-oxo-histidina (14 Da).

La Figura 3 representa un mecanismo propuesto para oxidación de histidina a 2-oxo-histidina (16 Da).

La Figura 4 representa un mecanismo propuesto para la oxidación de triptofano a N-formilcinurenina y cinurenina.

La Figura 5 representa una modalidad ejemplar para la producción de aflibercept.

La Figura 6 representa una modalidad ejemplar para la producción de MiniTrampa del VEGF.

La Figura 7 representa una modalidad ejemplar para la producción de aflibercept.

La Figura 8 representa una modalidad ejemplar para la producción de MiniTrampa del VEGF.

La Figura 9 representa un diagrama de estándares de BY calculados contra el valor b* calculado de acuerdo con una modalidad ejemplar.

La Figura 10 representa resultados de un experimento realizado para evaluar el porcentaje de 2-oxo-histidinas y oxidación de triptofano (donde el subrayado representa oxidación del residuo) en oligopéptidos a partir de carga de AEX digerida por proteasa y flujo continuo, que incluye fragmentos de aflibercept alquilado y reducido (SEQ ID NO.: 55), que incluye SEQ ID NOS.: 114-115, 21, 115, 28, 28, 20, 18, 17, 116-117, y 19, respectivamente, en orden de aparición.

La Figura 11 representa la abundancia relativa de los péptidos identificados a partir del análisis de mapeo peptídico realizado usando oligopéptidos a partir de carga de AEX digerida por proteasa y flujo continuo (donde el subrayado representa oxidación del residuo en la secuencia peptídica), que incluye fragmentos de aflibercept (SEQ ID NO.: 55), que incluye SEQ ID NOS.: 22, 18, 21, 19-20, 118-119, y 28-29, respectivamente, en orden de aparición.

La Figura 12**A** representa una vista completa del diagrama de cromatograma de absorbancia contra el tiempo (minutos) para MT4 y MT1 a 350 nm.

La Figura 12**B** representa una vista ampliada del diagrama de cromatograma de la absorbancia contra el tiempo (16-30 minutos) para MT4 y MT1 a 350 nm, que incluye SEQ ID NOS.: 21, 28, y 28, respectivamente, en orden de aparición.

La Figura 12**C** representa una vista ampliada del diagrama de cromatograma de la absorbancia

contra el tiempo (30-75 minutos) para MT4 y MT1 a 350 nm, que incluye SEQ ID NOS.: 17, 20, 18, y 19, respectivamente, en orden de aparición.

La Figura 13 representa resultados de un experimento realizado para evaluar el porcentaje de 2-oxo-histidinas (y dioxidación de triptofano) en oligopéptidos a partir de MT1 digerido por proteasa el cual se ha procesado por cromatografía de AEX y oligopéptidos a partir de MT1 digerido por proteasa el cual se ha extraído a partir de cromatografía de AEX, que incluye SEQ ID NOS.: 21, 28, 17, 20, y 18-19, respectivamente, en orden de aparición.

La Figura 14 representa los resultados de un experimento realizado para comparar las especies acídicas presentes en diferentes lotes de producción de MT1 y las fracciones de ácido acídicas obtenidas realizando una cromatografía de intercambio catiónico fuerte (CEX, por sus siglas en inglés), que incluye SEQ ID NOS.: 21, 28, 28, 17, 20, y 18-19, respectivamente, en orden de aparición.

La Figura 15 representa un método ejemplar para el enriquecimiento de las especies acídicas y otras variantes presentes en las muestras recolectadas del cultivo celular usando cromatografía de intercambio catiónico fuerte.

La Figura 16 representa las fracciones de realizar cromatografía de intercambio catiónico fuerte de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 17 representa cromatogramas de intercambio catiónico fuerte realizados de conformidad con una modalidad ejemplar para la producción de MT1 (previo a cualquier procedimiento de producción, ≤BY3) sometido a CEX y para variantes enriquecidas de MiniTrampa desialilada (dsMT1) usando un gradiente de sal-pH dual.

La Figura 18**A** representa un cromatograma 3D para control parental no fraccionado llevado a cabo por cromatografía de intercambio catiónico fuerte de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 18**B** representa un cromatograma 3D para MT1, fracción 1 que representa algunas de las características de cola para el experimento llevado a cabo por cromatografía de intercambio catiónico fuerte de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 18**C** representa un cromatograma 3D para MT1, característica de la fracción 2 llevada a cabo por cromatografía de intercambio catiónico fuerte de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 18**D** representa un cromatograma 3D para MT1, característica de la fracción 3 llevada a cabo por cromatografía de intercambio catiónico fuerte de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 18**E** representa un cromatograma 3D para MT1, característica de la fracción 4 llevada a cabo por cromatografía de intercambio catiónico fuerte de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 18**F** representa un cromatograma 3D para MT1, característica de la fracción 5 llevada a cabo por cromatografía de intercambio catiónico fuerte de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 18**G** representa un cromatograma 3D para MT1, característica de la fracción 6 llevada a cabo por cromatografía de intercambio catiónico fuerte de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 18**H** representa un cromatograma 3D para MT1, característica de la fracción 7 llevada a cabo por cromatografía de intercambio catiónico fuerte de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 19 representa electroferogramas de enfoque isoeléctrico capilar de imagen (icIEF) realizados de conformidad con una modalidad ejemplar para la producción de MT1.

La Figura 20 representa resultados de un estudio que correlación la exposición de luz blanca fría MT1 o luz UVA con la aparición de residuos de aminoácido oxidados, que incluye SEQ ID NOS.: 114, 114-115, 21, 115, 28, 28, 28, 17, 83, 20, 18, 29, 29, 19, y 22, respectivamente, en orden de aparición.

La Figura 21 representa los cromatogramas 3D SEC-PDA (cromatografía de exclusión de tamaño acoplada a detección de arreglo de fotodiodo) en MT1 estresado con CW con absorbancia a ~350 nm (*véase, por ejemplo,* círculo resaltado ~350 nm) de conformidad con una modalidad ejemplar donde **A** muestra el cromatograma a T=0, **B** muestra el cromatograma a 0.5x ICH, .**C** muestra el cromatograma a 2.0x ICH, y **D** muestra imágenes de MT1 en viales (normalizados a 80 mg/mL) estresados por CWL por diferentes intervalos de tiempo.

La Figura 22 representa los cromatogramas 3D SEC-PDA en MT1 estresado con UVA con absorbancia a ~350 nm (*véase, por ejemplo,* círculo resaltado ~350 nm) de conformidad con una modalidad ejemplar donde **A** muestra el cromatograma a T=0, **B** muestra el cromatograma a 0.5x ICH, .**C** muestra el cromatograma a 2.0x ICH, y **D** muestra imágenes de MT1 en viales (normalizados a 80 mg/mL) estresados por UVA por diferentes intervalos de tiempo.

La Figura 23**A** representa las relaciones de absorbancia A320/280 cuantificadas a partir de cromatogramas de SEC-PDA para las muestras estresadas usando CWL (panel superior) y **B** representa un diagrama de relaciones de absorbancia A320/280 por variantes de tamaño en las muestras estresadas usando CWL (panel inferior), en donde las muestras son estresadas de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 24**A** representa las relaciones de absorbancia A320/280 cuantificadas a partir de cromatogramas de SEC-PDA para las muestras estresadas usando UVA (panel superior) y **B** representa un diagrama de relaciones de absorbancia A320/280 por variantes de tamaño en las muestras estresadas usando UVA (panel inferior), en donde las muestras son estresadas de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 25**A** representa una escala estimada del efecto que tiene la incubación de varios componentes con aflibercept en la generación de color (CIE L*, a*, valor b predicho b*); y **B** representa actual contra el trazo del valor b predicho.

La Figura 26**A** representa el efecto de CDMs que comprenden cisteína y metales bajos en el titulador de aflibercept, la Figura 26**B** representa el efecto de CDM que comprenden baja cisteína y bajos metales en la concentración de células viables, la Figura 26**C** representa el efecto de CDM que comprenden baja cisteína y bajos metales en la viabilidad, la Figura 26**D** representa el efecto de CDM que comprenden baja cisteína y bajos metales en el amoníaco, y la Figura 26**E** representa el efecto de CDM que comprenden baja cisteína y bajos metales en la osmolalidad.

La Figura 27 es un diagrama que muestra el perfil de predicción del color de lo recolectado (visto como valores b* en el Día 13) en concentraciones aumentadas/reducidas de metales y cisteína de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 28 (28**A-**28**B**) representa el efecto de incubación de varios componentes con aflibercept en CDM gastado en la generación de color (CIE L*, a*, valor b predicho b*) (28**A**); y por un trazo de impactos predichos escalados en el valor b (28**B**).

La Figura 28**C** representa los efectos estimados escalados de incubación de varios componentes con aflibercept en CDM en la generación de color (CIE L*, a*, valor b predicho b*) en un cultivo de matraz sacudido.

La Figura 28**D** representa el efecto de incubación de hipotaurina y sal de mesilato de deferoxamina (DFO) con aflibercept en CDM gastado en la generación de color (CIE L*, a*, valor “b” predicho b*).

La Figura 28**E** representa el efecto de incubación de varios componentes individualmente con aflibercept de cultivo de matraz sacudido en la generación de color (CIE L*, a*, valor “b” predicho b*).

La Figura 29 es un diagrama que muestra el efecto de adición de uridina, manganeso, galactosa y dexametasona en CDMs en el titulador del aflibercept producido.

La Figura 30 es un diagrama que muestra el efecto de adición de uridina, manganeso, galactosa y dexametasona en CDMs en la viabilidad de células que expresan aflibercept, en donde se produce el aflibercept.

La Figura 31 es un diagrama que muestra el efecto de adición de uridina, manganeso, galactosa y dexametasona en CDMs en el conteo de células viables de células que expresan aflibercept, en donde se produce el aflibercept.

La Figura 32 es un diagrama que muestra una curva estándar de la absorbancia contra la concentración de proteínas de célula hospederas (ng/mL) preparada usando soluciones estándares de proteína de célula hospedera a partir de Cygnus 3G (F550).

La Figura 33 es una imagen de análisis de SDS-PAGE realizado usando amortiguador de muestra SDS-PAGE sin reducción.

La Figura 34 es una imagen de análisis de SDS-PAGE realizada usando amortiguador de muestra

SDS-PAGE reducido.

La Figura 35**A** es un diagrama de la proteína de célula hospedera total detectada en la solución de carga, fracciones eluidas a partir de columnas de cromatografía de afinidad 1-3 que comprenden $VEGF_{165}$, mAb1 y mAb2, respectivamente.

La Figura 35**B** es un diagrama de proteínas de células hospederas totales detectadas en la solución de carga, fracciones eluidas a partir de columnas de cromatografía de afinidad 1, 2, 4 y 5 que comprenden $VEGF_{165}$, mAb1, mAb3 y mAb4, respectivamente.

La Figura 36**A** representa los perfiles de SEC de MiniTrampa del VEGF antes y la Figura 36**B** representa los perfiles de SEC de MiniTrampa del VEGF después de realizar producción de cromatografía de afinidad.

La Figura 37 representa una representación de dibujo del estudio de cinética de MiniTrampa del VEGF a $VEGF_{165}$, en donde los constructos de MiniTrampa del VEGF estudiados fueron antes y después de realizar producción de cromatografía de afinidad de conformidad con algunas modalidades ejemplares.

La Figura 38 representa sensorgramas de SPR a partir del estudio de cinética de MiniTrampa del VEGF a $VEGF_{165}$, en donde los constructos de MiniTrampa del VEGF estudiados fueron antes y después de realizar producción de cromatografía de afinidad de conformidad con algunas modalidades ejemplares.

La Figura 39 es un diagrama de la proteína de célula hospedera total detectada en la solución de carga, fracciones eluidas a partir de columnas de cromatografía de afinidad usadas repetidamente para columnas que comprenden $VEGF_{165}$, mAb1 y mAb2.

La Figura 40 representa la estructura de MiniTrampa del VEGF MT1 (SEQ ID NO.: 46) de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 41 representa la estructura de MiniTrampa del VEGF MT6 (SEQ ID NO.: 51) de conformidad con una modalidad ejemplar.

La Figura 42 representa los Cromatogramas Iónicos Totales (TIC) de absorbancia relativa contra tiempo (minutos) para análisis SEC-MS nativo de MT1, MT5 y MT6 y una vista en acercamiento de región de bajo peso molecular de los TICs.

La Figura 43 representa espectros de masas desconvolucionado del pico principal para MT1 y MT5 para conformar la identidad del dímero de MiniTrampa con elucidación para algunos PTMs, con los aminoácidos N-terminales indicados (SEQ ID NO.: 120).

La Figura 44 representa un espectro de masas desconvolucionado del pico principal para MT6 para confirmar la identidad de MiniTrampa de cadena única con elucidación para algunos PTMs.

La Figura 45**A** representa un diagrama de absorbancia relativa contra el tiempo (minutos) para

impurezas de bajo peso molecular en MT1.

La Figura 45**B** representa el espectro de masas para las impurezas de bajo peso molecular en MT1.

La Figura 46 representa la absorbancia relativa contra el tiempo (minutos) para MT1 el cual muestra la ausencia de la enzima FabRICATOR la cual se usó para escindir aflibercept en MT1.

La Figura 47 representa la absorbancia relativa contra el tiempo (minutos) para impurezas de bajo peso molecular en MT5.

La Figura 48 representa la absorbancia relativa contra el tiempo (minutos) para impurezas de bajo peso molecular en MT6.

La Figura 49**A** representa un diagrama de la absorbancia contra el tiempo (minutos) obtenido realizando HILIC-UV/MS para MiniTrampa del VEGF MT6, en donde el diagrama muestra la elución del pico principal a 21 minutos y O-glicanos a aproximadamente 21.5 minutos.

La Figura 49**B** representa un espectro de masas obtenido realizando HILIC-UV/MS para MiniTrampa del VEGF MT6 que muestra el pico principal a 47985.8 Da.

La Figura 49**C** representa un espectro de masas de O-glicanos de MiniTrampa del VEGF MT6 obtenido realizando HILIC-UV/MS.

La Figura 50 es una imagen del dímero de MiniTrampa del VEGF en donde el puente de disulfuro en la región bisagra (SEQ ID NO.: 83, 123, 83, y 123) de la MiniTrampa del VEGF puede ser paralela o cruzada.

La Figura 51 representa abundancia relativa de distribución de glicanos observada a Asn36 entre MT1, MT5 y MT6. La figura describe SEQ ID NO.: 121.

La Figura 52 representa abundancia relativa de distribución de glicanos observada a Asn68 entre MT1, MT5 y MT6. La figura describe SEQ ID NOS.: 101 y 30, respectivamente, en orden de aparición.

La Figura 53 representa abundancia relativa de distribución de glicanos observada a Asn123 entre MT1, MT5 y MT6. La figura describe SEQ ID NO.: 82.

La Figura 54 representa abundancia relativa de distribución de glicanos observada a Asn196 entre MT1, MT5 y MT6. La figura describe SEQ ID NOS.: 103 y 122, respectivamente, en orden de aparición.

La Figura 55 representa el análisis de glicano N-ligado liberado por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) acoplada a análisis de detección de fluorescencia y espectrometría de masas (escala completa y apilado).

La Figura 56 representa cromatogramas de HILIC-FLR para MT1, MT5 y MT6.

La Figura 57 representa el análisis de glicano N-ligado liberado por HILIC acoplado a análisis de detección de fluorescencia y espectrometría de masas (escala completa, apilado y normalizado).

La Figura 58**A** es una tabla de identificación y cuantificación detallada de glicano a partir de muestras de MiniTrampa del VEGF MT1, MT5 y MT6.

La Figura 58**B** es una tabla de identificación y cuantificación detallada de glicano a partir de muestras de MiniTrampa del VEGF MT1, MT5 y MT6.

La Figura 58**C** es una tabla de identificación y cuantificación detallada de glicano a partir de muestras de MiniTrampa del VEGF MT1, MT5 y MT6.

La Figura 59 representa un procedimiento de producción ejemplar para manufacturar la MiniTrampa de conformidad con una modalidad ejemplar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos de la vasculatura preexistente, es un proceso altamente orquestado que es crítico para el desarrollo embriónico apropiado y vascular postnatal. La angiogénesis anormal o patológica es un sello del cáncer y varias enfermedades retinales donde la regulación ascendente de factores proangiogénicos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) conduce a incremento en la proliferación endotelial, cambios en la morfología de la vasculatura y permeabilidad vascular aumentada. Niveles elevados del VEGF se han encontrado en el fluido vítreo y vasculatura retinal de pacientes con varias enfermedades oculares. El bloqueo de la actividad del VEGF también ha llegado a ser la terapia de elección para tratar DME, AMD húmeda, CNV, oclusiones de la vena retinal, y otras enfermedades oculares donde la angiogénesis anormal es la etiología fundamental.

Como se usa en la presente, el aflibercept es una de tal proteína anti-VEGF que comprende una secuencia de aminoácido completamente humana que comprende el segundo dominio Ig de VEGFR1 humano y el tercer dominio Ig de VEGFR2 humano expresado como una fusión en línea con un (Fc) de IgG1 humano. El aflibercept se une a todas las formas de VEGF-A (VEGF) pero además se une a PlGF y VEGF-B. Varios otras MiniTrampas del VEGF homodiméricas se han generado como productos enzimáticamente escindidos a partir de aflibercept o recombinantemente expresados directamente a partir de líneas de células hospederas. Un ejemplo de tal MiniTrampa del VEGF se muestra en la **Figura 1**. En esta figura, una lisina terminal es representada (K), algunos procesos de cultivo remueven esta lisina terminal mientras otros no lo hacen. La **Figura 1** ilustra un proceso por medio del cual la lisina terminal permanece. En general, el aflibercept abarca tanto la presencia como ausencia de la lisina terminal.

Como se demuestra en la presente, la presente invención, en parte, describe la producción de proteínas anti-VEGF (Ejemplo 1) usando un CDM. El análisis de soluciones que comprenden aflibercept producido usando ciertos CDMs demuestra una cierta propiedad de color, tal como un color amarillo-marrón intenso. La intensidad del color de la solución depende del CDM usado. No

todos los CDMs examinados producen una muestra con un color amarillo-marrón distinto después que las soluciones se normalizaron a una concentración de 5 g/L.

Un color, tal como amarillo-marrón, en una solución de fármaco terapéutico inyectable, puede ser una característica indeseada. Puede ser un parámetro importante empleado para determinar si un producto de fármaco satisface un nivel predeterminado de pureza y calidad para un terapéutico particular. Un color tal como amarillo-marrón observado a lo largo de la ruta de manufacturación de un producto biológico puede ser causado por modificaciones químicas de tales productos de degradación, productos biológicos de excipientes de formulación, o productos de degradación formados a través de la reacción del producto biológico y excipientes de formulación. Sin embargo, tal información puede ser valiosa para entender la causa del cambio de color. También puede ayudar en designar condiciones de almacenamiento a corto plazo, así como también a largo plazo, para prevenir modificaciones que facilitan tal cambio de color.

Los inventores observaron que el uso de AEX durante la producción de una solución de proteína anti-VEGF minimiza la coloración amarillo-marrón. Adicionalmente, los inventores descubrieron que la coloración amarillo-marrón puede ser reducida modificando el cultivo celular usado para producir una proteína recombinante, tal como aflibercept o un aflibercept modificado como MiniTrampa.

La presente invención abarca proteínas anti-VEGF y su producción usando CDM. Adicionalmente, la presente invención se basa en la identificación y optimización de tecnologías de procesos en dirección ascendente y dirección descendente para la producción de proteína.

Como se demuestra en la presente, algunos de los Ejemplos expuestos abajo describen la producción de proteínas anti-VEGF (Ejemplo 1), producción de especies oxidadas de proteínas anti-VEGF (Ejemplo 4), métodos para reducir las especies oxidadas de proteínas anti-VEGF optimizando el medio de cultivo (Ejemplo 5) y optimizando los métodos de producción (Ejemplo 2).

Un número de recientes solicitudes de patente y patentes otorgadas pretenden describir varias especies de aflibercept y métodos para producir las mismas, pero ninguna describe o sugiere las composiciones anti-VEGF y métodos para producir las mismas descritas en la presente. *Véase, por ejemplo,* Solicitud Estadounidense No. 16/566,847 por Coherus Biosciences Inc., Patente Estadounidense No. 10,646,546 por Sam Chun Dang Pharm. Co., Ltd., Patente Estadounidense No. 10,576,128 por Formycon AG, Solicitud Internacional No. PCT/US2020/015659 por Amgen Inc., y Patentes Estadounidenses Nos. 8,956,830; 9,217,168; 9,487,810; 9,663,810; 9,926,583; y 10,144,944 por Momentun Pharmaceuticals, Inc.

I. Explicación de Términos Seleccionados

A menos que se describa de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por uno de habilidad ordinaria

en la técnica a la cual pertenece esta invención. Los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente conocidos por el experto en la técnica pueden ser usados en la práctica de modalidades particulares descritas en la presente. Todas las publicaciones mencionadas están de este modo incorporadas por referencia en su totalidad.

El término “uno” debe entenderse por significar “al menos uno” y los términos “alrededor de” y “aproximadamente” deben ser entendidos por permitir la variación estándar como se podría entender por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica y donde se proporcionan intervalos, los puntos finales son incluidos.

Como se usa en la presente, el término “trastorno ocular angiogénico” significa cualquier enfermedad del ojo, la cual es causada por, o asociada con el crecimiento o proliferación de vasos sanguíneos o por fuga de vasos sanguíneos.

Como se usa en la presente, el término “medio químicamente definido” o “medios químicamente definidos” (ambos abreviados “CDM”) se refiere a un medio de crecimiento sintético en el cual se definen la identidad y concentración de todos los ingredientes. Los medios químicamente definidos no contienen extractos bacterianos, levadura, animal o plantas, suero o plasma animal, aunque componentes individuales derivados de animales o plantas (*por ejemplo,* proteínas, polipéptidos, etc), pueden ser agregados. Los medios químicamente definidos pueden contener sales inorgánicas tales como fosfatos, sulfatos, y similares, necesarios para soportar el crecimiento. La fuente de carbono es definida, y es usualmente un azúcar tal como glucosa, lactosa, galactosa, y similares, u otros compuestos tales como glicerol, lactato, acetato, y similares. Mientras ciertos medios de cultivo químicamente definidos también usan sales de fosfato como un amortiguador, otros amortiguadores pueden ser empleados, tales como bicarbonato de sodio, HEPES, citrato, trietanolamina, y similares. Ejemplos de medios químicamente definidos comercialmente disponibles incluyen, pero no se limitan a, varios medios de Eagle Modificado de Dulbecco (DME) (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc)., Mezcla Nutriente de Ham (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc)., varios medios EX-CELL (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), varios medios IS CHO-CD (FUJIFILM Irvine Scientific), combinaciones de los mismos, y similares. Los métodos para preparar medios de cultivo químicamente definidos se conocen en la técnica, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 6,171,825 y 6,936,441, WO 2007/077217, y Publicaciones de Solicitud de Patente Estadounidense Nos. 2008/0009040 y 2007/0212770, las enseñanzas completas de las cuales se incorporan en la presente por referencia.

Como se usa en la presente, el término “cantidad acumulativa” se refiere a la cantidad total de un componente particular agregado a un biorreactor durante el curso del cultivo celular para formar el CDM, que incluye cantidades agregadas al comienzo del cultivo (CDM en el día 0) y cantidades

subsecuentemente agregadas de los componentes. Cantidades de un componente agregado a un cultivo de tren de siembra o inóculo previo a la producción del biorreactor (*es decir,* previo al CDM en el día 0) también se incluyen cuando se calcula la cantidad acumulativa de los componentes. Una cantidad acumulativa es no afectada por la pérdida de un componente con el tiempo durante el cultivo (por ejemplo, a través del metabolismo o degradación química). De este modo, dos cultivos con las mismas cantidades acumulativas de un componente pueden, no obstante, tener diferentes niveles absolutos, por ejemplo, si el componente se agrega a los dos cultivos a diferentes tiempos (*por ejemplo,* si en un cultivo todos los componentes se agregan al principio, y en otro cultivo el componente se agrega con el tiempo). Una cantidad acumulativa es también no afectada por síntesis *in situ* de un componente con el tiempo durante el cultivo (por ejemplo, mediante metabolismo o conversión química). De este modo, dos cultivos con las mismas cantidades acumulativas de un componente dado pueden, no obstante, tener diferentes niveles absolutos, por ejemplo, si el componente es sintetizado *in situ* en uno de los dos cultivos por medio de un proceso de bioconversión. Una cantidad acumulativa puede ser expresada en unidades tal como, por ejemplo, gramos o moles de los componentes.

Como se usa en la presente, el término “concentración acumulativa” se refiere a la cantidad acumulativa de un componente, dividida por el volumen del líquido en el biorreactor al comienzo del lote de producción, que incluye la contribución al volumen de partida a partir de cualquier inóculo usado en el cultivo. Por ejemplo, si un biorreactor contiene 2 litros de medio de cultivo celular al comienzo del lote de producción, y un gramo del componente X se agrega en los días 0, 1, 2, y 3, después la concentración acumulativa después del día 3 es 2 g/L (*es decir,* 4 gramos dividido por 2 litros). Sí, en el día 4, un adicional de un litro de líquido que no contiene el componente X se agregan al biorreactor, la concentración acumulativa podría permanecer 2 g/L. Sí, en el día 5, alguna cantidad de líquido se pierden a partir del biorreactor (por ejemplo, a través de la evaporación), la concentración acumulativa podría permanecer 2 g/L. Una concentración acumulativa puede ser expresada en unidades tales como, por ejemplo, gramos por litro o moles por litro.

Como se usa en la presente, el término “formulación” se refiere a una proteína de interés que es formulada junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En un aspecto, la proteína de interés es aflibercept y/o MiniTrampa. En algunas modalidades ejemplares, la cantidad de proteína de interés en la formulación puede variar desde aproximadamente 0.01 mg/mL hasta aproximadamente 600 mg/mL. En algunas modalidades específicas, la cantidad de la proteína de interés en la formulación puede ser de aproximadamente 0.01 mg/mL, aproximadamente 0.02 mg/mL, aproximadamente 0.03 mg/mL, aproximadamente 0.04 mg/mL, aproximadamente 0.05 mg/mL, aproximadamente 0.06 mg/mL, aproximadamente 0.07 mg/mL, aproximadamente 0.08

mg/mL, aproximadamente 0.09 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL, aproximadamente 0.2 mg/mL, aproximadamente 0.3 mg/mL, aproximadamente 0.4 mg/mL, aproximadamente 0.5 mg/mL, aproximadamente 0.6 mg/mL, aproximadamente 0.7 mg/mL, aproximadamente 0.8 mg/mL, aproximadamente 0.9 mg/mL, aproximadamente 1 mg/mL, aproximadamente 2 mg/mL, aproximadamente 3 mg/mL, aproximadamente 4 mg/mL, aproximadamente 5 mg/mL, aproximadamente 6 mg/mL, aproximadamente 7 mg/mL, aproximadamente 8 mg/mL, aproximadamente 9 mg/mL, aproximadamente 10 mg/mL, aproximadamente 15 mg/mL, aproximadamente 20 mg/mL, aproximadamente 25 mg/mL, aproximadamente 30 mg/mL, aproximadamente 35 mg/mL, aproximadamente 40 mg/mL, aproximadamente 45 mg/mL, aproximadamente 50 mg/mL, aproximadamente 55 mg/mL, aproximadamente 60 mg/mL, aproximadamente 65 mg/mL, aproximadamente 70 mg/mL, aproximadamente 75 mg/mL, aproximadamente 80 mg/mL, aproximadamente 85 mg/mL, aproximadamente 90 mg/mL, aproximadamente 100 mg/mL, aproximadamente 110 mg/mL, aproximadamente 120 mg/mL, aproximadamente 130 mg/mL, aproximadamente 140 mg/mL, aproximadamente 150 mg/mL, aproximadamente 160 mg/mL, aproximadamente 170 mg/mL, aproximadamente 180 mg/mL, aproximadamente 190 mg/mL, aproximadamente 200 mg/mL, aproximadamente 225 mg/mL, aproximadamente 250 mg/mL, aproximadamente 275 mg/mL, aproximadamente 300 mg/mL, aproximadamente 325 mg/mL, aproximadamente 350 mg/mL, aproximadamente 375 mg/mL, aproximadamente 400 mg/mL, aproximadamente 425 mg/mL, aproximadamente 450 mg/mL, aproximadamente 475 mg/mL, aproximadamente 500 mg/mL, aproximadamente 525 mg/mL, aproximadamente 550 mg/mL, aproximadamente 575 mg/mL, o aproximadamente 600 mg/mL. En algunas modalidades ejemplares, el pH de la composición puede ser mayor de aproximadamente 5.0. En una modalidad ejemplar, el pH puede ser mayor de aproximadamente 5.0, mayor de aproximadamente 5.5, mayor de aproximadamente 6.0, mayor de aproximadamente 6.5, mayor de aproximadamente 7.0, mayor de aproximadamente 7.5, mayor de aproximadamente 8.0, o mayor de aproximadamente 8.5.

Como se usa en la presente, el término “base de datos” se refiere a una herramienta bioinformática, la cual proporciona la posibilidad de buscar el espectro MS-MS no interpretado contra todas las secuencias posibles en la(s) base(s) de dato(s). Ejemplos no limitantes de tales herramientas son Mascot (www.matrixscience.com), Spectrum Mill (www.chem.agilent.com), PLGS (www.waters.com), PEAKS (www.bioinformaticssolutions.com), Proteinpilot (download.appliedbiosystems.com//proteinpilot), Phenyx (www.phenyx-ms.com), Sorcerer (www.sagenresearch.com), OMSSA (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/), X!Tandem (www.thegpm.org/TANDEM/), Protein Prospector

(www.prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm), Byonic (www.proteinmetrics.com/products/byonic) o Sequest (fields.scripps.edu/sequest).

Como se usa en la presente, el término “ultrafiltración” o “UF” puede incluir un proceso de membrana de filtración similar a ósmosis inversa, usando presión hidrostática para forzar el agua a través de una membrana semi-permeable. La ultrafiltración se describe en detalle en: LEOS J. ZEMAN & ANDREW L. ZYDNEY, MICROFILTRATION AND ULTRAFILTRATION: PRINCIPLES AND APPLICATIONS (1996), las enseñanzas completas de la cual se incorporan en la presente. Los filtros con un tamaño de poro menor de 0.1 µm pueden ser usados para ultrafiltración. Empleando filtros que tienen tal tamaño de poro pequeño, el volumen de la muestra puede ser reducido a través de la permeación del amortiguador de muestra a través del filtro, mientras las proteínas son retenidas detrás del filtro.

Como se usa en la presente, “diafiltración” o “DF” puede incluir un método para usar ultrafiltros para remover e intercambiar sales, azúcares, y solventes no acuosos, para separar las especies libres de las unidas, para remover el material de bajo peso molecular, y/o causar el cambio rápido de ambientes iónicos y/o pH. Los microsolutos son removidos más eficientemente agregando solvente a una solución que es ultrafiltrada a una velocidad aproximadamente igual a la velocidad de ultrafiltración. Estas microespecies son lavadas de la solución a un volumen constante. En ciertas modalidades ejemplares de la presente invención, una etapa de diafiltración puede ser empleada para cambiar varios amortiguadores usados en conjunto con la presente invención, por ejemplo, previo a la cromatografía u otras etapas de producción, así como también para remover impurezas a partir de la preparación de proteína. Como se usa en la presente, el término “tecnología de proceso en dirección descendente” se refiere a una o más técnicas usadas después de las tecnologías del proceso en dirección ascendente para producir una proteína. La tecnología de proceso en dirección descendente incluye, por ejemplo, producto de producción de una proteína, usando, por ejemplo, cromatografía de afinidad, que incluye cromatografía de afinidad de Proteína A así como también cromatografía de afinidad que usa una fase sólida que tiene una molécula bien definida como VEGF que puede interactuar con su cognato como un receptor del VEGF (VEGFR), cromatografía de intercambio iónico, tal como cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, o cromatografía por desplazamiento.

La frase “célula hospedera recombinante” (o simplemente “célula hospedera”) incluye una célula en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica para una proteína de interés. Se debe entender que tal término está propuesto para referirse no solamente a una célula objetivo particular, sino a una progenie de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a ya sea mutación o influencias ambientales, tal progenie

no puede, en efecto, ser idéntica a la célula precursora, sino todavía estar incluida dentro del alcance del término “célula hospedera” como se usa en la presente. En una modalidad, las células hospederas incluyen células procarióticas y eucarióticas seleccionadas a partir de cualquiera de los reinos de vida. En un aspecto, las células eucarióticas incluyen células protistas, fúngicas, de plantas y animales. En un aspecto adicional, las células hospederas incluyen células eucarióticas tales como células de plantas y/o animales. Las células pueden ser células de mamífero, células de peces, células de insecto, células de anfibio o células de aves. En un aspecto particular, la célula hospedera es una célula de mamífero. Una amplia variedad de líneas de células de mamífero adecuadas para crecimiento en cultivo está disponible a partir de la American Type Culture Collection (Manassas, Va). y otros depositorios, así como también vendedores comerciales. Las células que pueden ser usadas en los procesos de la invención incluyen, pero no se limitan a, células MK2.7, células PER-C6, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), tales como CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin *et al*., 1986, *Som. Cell Molec. Genet.,* 12:555-556; Kolkekar *et al*., 1997, *Biochemistry,* 36: 10901-10909; y WO 01/92337 A2), células CHO negativas a dihidrofolato reductasa (CHO/-DHFR, Urlaub and Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 77:4216), y células dp12.CHO (Patente Estadounidense No. 5,721,121); células renales de mono (CV1, ATCC CCL-70); células CV1 renales de mono transformadas por SV40 (células COS, COS-7, ATCC CRL-1651); células HEK 293, y células Sp2/0, células de hibridoma 5L8, células Daudi, células EL4, células HeLa, células HL-60, células K562, células Jurkat, células THP-1, células Sp2/0, células epiteliales primarias (*por ejemplo,* queratinocitos, células epiteliales cervicales, células epiteliales bronquiales, células epiteliales traqueales, células epiteliales renales, y células epiteliales retinales) y líneas de células establecidas y sus cepas (*por ejemplo,* células renales embriónicas humanas (*por ejemplo,* células 293, o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al*., 1977, *J. Gen. Virol.,* 36:59); células renales de hámster bebé (BHK, ATCC CCL-10); células sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod., 23:243-251); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL-2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL-34); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL-75); células de hepatoma humano (HEP-G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL-51); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL-1442); células TRI (Mather, 1982, *Annals NY Acad. Sci.,* 383:44-68); células MCR 5; células FS4; células PER-C6 retinales, células MDBK (NBL-1), células 911, células CRFK, células MDCK, células BeWo, células Chang, células Detroit 562, células HeLa 229, células HeLa S3, células Hep-2, células KB, células LS 180, células LS 174T, células NCI-H-548, células RPMI 2650, células SW-13, células T24, células WI-28 VA13, células 2RA, células WISH, células BS-C-I, células LLC-MK_2, células del Clon M-3, células 1-10, células RAG, células TCMK-1, células Y-1, células LLC-PK_1, células PK(15), células GH_1, células

GH_3, células L2, células LLC-RC 256, células MH_1C_1, células XC, células MDOK, células VSW, células TH-I y B1, células o derivados de las mismas), células de fibroblasto de cualquier tejido u órgano (que incluyen pero no se limitan a corazón, hígado, riñón, colon, intestinos, esófago, estómago, tejido neural (cerebro, médula espinal), pulmón, tejido vascular (arteria, vena, capilar), tejido linfoide (glándula linfática, adenoide, amígdalas, médula ósea, y sangre), bazo, y fibroblasto y líneas de células similares a fibroblastos (*por ejemplo,* células TRG-2, células IMR-33, células Don, células GHK-21, células de citrulinemia, células Dempsey, células Detroit 551, células Detroit 510, células Detroit 525, células Detroit 529, células Detroit 532, células Detroit 539, células Detroit 548, células Detroit 573, células HEL 299, células IMR-90, células MRC-5, células WI-38, células WI-26, células $MiCl_1$, células CV-1, células COS-1, células COS-3, células COS-7, células renales de mono verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81); células DBS-FrhL-2, células BALB/3T3, células F9, células SV-T2, células M-MSV-BALB/3T3, células K-BALB, células BLO-11, células NOR-10, células C_3H/IOTI/2, células $HSDM_1C_3$, células KLN205, células McCoy, células L de Ratón, células de Cepa 2071 (L de Ratón L), células de cepa L-M (L de Ratón), células L-MTK (L de Ratón), células NCTC clones 2472 y 2555, células SCC-PSA1, células Swiss/3T3, células Muntajc Indias, células SIRC, células C_{II}, y células Jensen, o derivados de las mismas) o cualquier otro tipo de célula conocido por un experto en la técnica.

Como se usa en la presente, el término “proteínas de célula hospedera” (HCP) incluye proteína derivada de una célula hospedera y puede ser no relacionada a la proteína de interés deseada. Las proteínas de célula hospedera pueden ser una impureza relacionada al proceso la cual puede ser derivada del proceso de manufacturación y puede incluir tres categorías mayores: derivadas de sustrato celular, derivadas de cultivo celular y derivadas en dirección descendente. Las impurezas derivadas de sustrato celular incluyen, pero no se limitan a, proteínas derivadas de un organismo hospedero y ácido nucleico (genómico de célula hospedera, vector, o ADN total). Las impurezas derivadas de cultivo celular incluyen, pero no se limitan a, inductores, antibióticos, suero y otros componentes de los medios. Las impurezas derivadas en dirección descendente incluyen, pero no se limitan a, enzimas, reactivos de procesamiento químico y bioquímico (*por ejemplo,* bromuro de cianógeno, guanidina, agentes oxidantes y reductores), sales inorgánicas (*por ejemplo,* metales pesados, arsénico, ion no metálico), solventes, portadores, ligandos (*por ejemplo,* anticuerpos monoclonales), y otros lixiviables.

En algunas modalidades ejemplares, la proteína de célula hospedera puede tener una pI en el intervalo de aproximadamente 4.5 hasta aproximadamente 9.0. En una modalidad ejemplar, el pI puede ser de aproximadamente 4.5, aproximadamente 5.0, aproximadamente 5.5, aproximadamente 5.6, aproximadamente 5.7, aproximadamente 5.8, aproximadamente 5.9,

aproximadamente 6.0, aproximadamente 6.1, aproximadamente 6.2, aproximadamente 6.3, aproximadamente 6.4, aproximadamente 6.5, aproximadamente 6.6, aproximadamente 6.7, aproximadamente 6.8, aproximadamente 6.9, aproximadamente 7.0, aproximadamente 7.1 aproximadamente 7.2, aproximadamente 7.3, aproximadamente 7.4, aproximadamente 7.5, aproximadamente 7.6, aproximadamente 7.7, aproximadamente 7.8, aproximadamente 7.9, aproximadamente 8.0, aproximadamente 8.1, aproximadamente 8.2, aproximadamente 8.3, aproximadamente 8.4, aproximadamente 8.5, aproximadamente 8.6, aproximadamente 8.7, aproximadamente 8.8, aproximadamente 8.9, o aproximadamente 9.0.

Como se usa en la presente, el término “agente hidrolizante” se refiere a uno cualquiera o una combinación de un gran número de diferentes agentes que pueden realizar digestión de una proteína. Ejemplos no limitantes de agentes hidrolizantes que pueden llevar a cabo digestión enzimática incluyen proteasa de *Aspergillus saitoi*, elastasa, subtilisina, proteasa XIII, pepsina, tripsina, Tryp-N, quimiotripsina, aspergilopepsina I, proteasa LysN (Lys-N), endoproteinasa LysC (Lys-C), endoproteinasa Asp-N (Asp-N), endoproteinasa Arg-C (Arg-C), endoproteinasa Glu-C (Glu-C) u otra Proteína T de la membrana exterior (OmpT), enzima degradante de inmunoglobulina de *Streptococcus pyogenes* (IdeS), termolisina, papaína, pronasa, proteasa V8 o fragmentos biológicamente activos u homólogos de los mismos o combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitantes de agentes hidrolizantes que pueden llevar a cabo digestión no enzimática incluyen el uso de alta temperatura, microondas, ultrasonido, alta presión, infrarrojo, solventes (ejemplos no limitantes son etanol y acetonitrilo), digestión de enzima inmovilizada (IMER), enzimas inmovilizadas de partículas magnéticas, y enzimas inmovilizadas en el chip. Para una revisión reciente que discute las técnicas disponibles para digestión de proteína, véase Switzar *et al*., “Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments” (Linda Switzar, Martin Giera & Wilfried M. A. Niessen, *Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments*, 12 JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH 1067–1077 (2013), las enseñanzas completas de la cual se incorporan en la presente). Una o una combinación de agentes hidrolizantes puede escindir enlaces peptídicos en una proteína o polipéptido, en una manera específica de la secuencia, generando una recolección predecible de péptidos más cortos. La relación de agente hidrolizante a proteína y el tiempo requerido para digestión puede ser apropiadamente seleccionado para obtener digestión óptima de la proteína. Cuando la relación de enzima a sustrato es inadecuadamente alta, la velocidad de digestión correspondientemente alta no permitirá suficiente tiempo para que los péptidos sean analizados por espectrómetro de masas, y la cobertura de secuencia será comprometida. Por otro lado, una relación E/S baja podría necesitar digestión larga y de este modo largo tiempo de adquisición de datos. La relación de enzima a sustrato puede variar

desde aproximadamente 1:0.5 hasta aproximadamente 1:200. Como se usa en la presente, el término “digestión” se refiere a hidrólisis de uno o más enlaces peptídicos de una proteína. Existen varios procedimientos para llevar a cabo la digestión de una proteína en una muestra biológica usando un agente hidrolizante apropiado, por ejemplo, digestión enzimática o digestión no enzimática. Uno de los métodos ampliamente aceptados para digestión de proteínas en una muestra involucra el uso de proteasas. Muchas proteasas están disponibles y cada una de ellas tiene sus propias características en términos de especificidad, eficiencia, y condiciones de digestión óptima. Las proteasas se refieren a tanto endopeptidasas como exopeptidasas, como se clasifica con base en la capacidad de la proteasa para escindir a aminoácidos terminales o no terminales dentro de un péptido. Alternativamente, las proteasas también pueden referirse a las seis clases distintas - aspártico, glutámico, y metaloproteasas, cisteína, serina, y treonina proteasas, ya clasificadas con base en el mecanismo de catálisis. Los términos “proteasa” y “peptidasa” son usados intercambiablemente para referirse a enzimas, las cuales hidrolizan los enlaces peptídicos.

El término “en asociación con” indica que los componentes, una composición anti-VEGF de la presente invención, junto con otro agente tal como anti-ANG2, puede ser formulada en una composición única para suministro simultáneo, o formulada separadamente en dos o más composiciones (*por ejemplo,* un kit que incluye cada componente). Los componentes administrados en asociación entre sí pueden ser administrados a un sujeto en un tiempo diferente que cuando el otro componente es administrado; por ejemplo, cada administración puede ser dada no simultáneamente (*por ejemplo,* separadamente o secuencialmente) a intervalos sobre un periodo de tiempo dado. Los componentes separados administrados en asociación entre sí pueden también ser administrados esencialmente simultáneamente (*por ejemplo,* precisamente al mismo tiempo o separado por un periodo de tiempo no clínicamente significante) durante la misma sesión de administración. Sin embargo, los componentes separados administrados en asociación entre sí pueden ser administrados a un sujeto por la misma o por una ruta diferente, por ejemplo, una composición de aflibercept junto con otro agente tal como anti-ANG2, en donde la composición de aflibercept comprende aproximadamente 15% o menos de sus variantes.

Como se usa en la presente, el término “cromatografía líquida” se refiere a un proceso en el cual una mezcla biológica/química llevada por un líquido puede ser separada en componentes como un resultado de distribución diferencial de los componentes conforme fluyen a través (o en) un líquido estacionario o fase sólida. Ejemplos no limitantes de cromatografía líquida incluyen cromatografía líquida de fase inversa, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía de modo mezclado, o cromatografía hidrofóbica.

Como se usa en la presente, “cromatografía de afinidad” puede incluir separaciones que incluyen

cualquier método por el cual dos sustancias son separadas con base en su afinidad a un material cromatográfico. Puede comprender someter las sustancias a una columna que comprende un medio cromatográfico de afinidad adecuado. Ejemplos no limitantes de tales medios cromatográficos incluyen, pero no se limitan a, resina de Proteína A, resina de Proteína G, soportes de afinidad que comprenden un antígeno contra el cual una molécula de unión (*por ejemplo,* anticuerpo) se produce, la proteína capaz de unirse a una proteína de interés y soporte de afinidad que comprende una proteína de unión a Fc. En un aspecto, una columna de afinidad puede ser equilibrada con un amortiguador adecuado previo a la carga de la muestra. Un ejemplo de un amortiguador adecuado puede ser un amortiguador de Tris/NaCl, pH alrededor de 7.0 hasta 8.0. Un experto en la técnica puede desarrollar un amortiguador adecuado sin carga indebida. Después de este equilibrio, una muestra puede ser cargada en la columna. Después de cargar la columna, la columna puede ser lavada una o múltiples veces usando, por ejemplo, el amortiguador de equilibrio. Otros lavados que incluyen lavados que emplean diferentes amortiguadores pueden ser usados antes de eluir la columna. La columna de afinidad puede entonces ser eluida usando un amortiguador de elución apropiado. Un ejemplo de un amortiguador de elución adecuado puede ser un amortiguador de ácido acético/NaCl, pH alrededor de 2.0 hasta 3.5. Nuevamente, el experto en la técnica puede desarrollar un amortiguador de elución apropiado sin carga indebida. Lo eluido puede ser monitoreado usando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica, que incluye UV. Por ejemplo, la absorbancia a 280 nm puede ser empleada específicamente si la muestra de interés comprende anillos aromáticos (*por ejemplo,* proteínas que tienen aminoácidos aromáticos como triptofano).

Como se usa en la presente, “cromatografía de intercambio iónico” puede referirse a separaciones que incluye cualquier método por el cual dos sustancias son separadas con base en diferencias en sus cargas iónicas respectivas, ya sea en la molécula de interés y/o material cromatográfico como un todo o localmente en regiones específicas de las moléculas de interés y/o material cromatográfico, y de este modo puede emplear ya sea material de intercambio catiónico o material de intercambio aniónico. La cromatografía de intercambio iónico separa moléculas con base en diferencias entre las cargas locales de las moléculas de interés y las cargas locales del material cromatográfico. Una columna de cromatografía de intercambio iónico empacada o dispositivo de membrana de intercambio iónico puede ser operada en un modo de unión-elución, un modo de flujo continuo, o un modo híbrido. Después de lavar la columna o el dispositivo de membrana con un amortiguador de equilibrio u otro amortiguador, la recuperación del producto se puede lograr incrementando la intensidad iónica (*es decir,* conductividad) del amortiguador de elución para competir con el soluto para los sitios cargados de la matriz de intercambio iónico. Cambiar al pH y de este modo alterar la carga del soluto puede ser otra forma para lograr la elución del soluto. El

cambio en la conductividad o pH puede ser gradual (elución de gradiente) o por etapas (elución de etapa). Los sustituyentes aniónicos o catiónicos pueden ser unidos a matrices con el fin de formar soportes aniónicos o catiónicos para cromatografía. Ejemplos no limitantes de sustituyentes de intercambio aniónico incluyen grupos dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amina cuaternaria (Q). Sustituyentes catiónicos incluyen carboximetilo (CM), sulfoetilo (SE), sulfopropilo (SP), fosfato (P) y sulfonato (S). Medios o soporte de intercambio iónico de celulosa pueden incluir DE23™, DE32™, DE52™, CM-23™, CM-32™, y CM-52™ están disponibles de Whatman Ltd. Maidstone, Kent, U.K. También se conocen intercambiadores iónicos reticulados y a base de SEPHADEX®. Por ejemplo, DEAE-, QAE-, CM-, y SP-SEPHADEX® y DEAE-, Q-, CM- y S-SEFAROSA® y SEFAROSA® Fast Flow, y Capto™ S son todos disponibles de GE Healthcare. Además, tanto copolímero de etilenglicol-metacrilato derivados de DEAE y CM tales como TOYOPEARL™ DEAE-650S o M y TOYOPEARL™ CM-650S o M, están disponibles de Toso Haas Co., Philadelphia, Pa., o Nuvia S y UNOSphere™ S de BioRad, Hercules, Calif., Eshmuno® S de EMD Millipore, MA.

Como se usa en la presente, el término “resina de cromatografía de interacción hidrofóbica” puede incluir una fase sólida, la cual puede ser covalentemente modificada con fenilo, octilo, butilo o similares. Puede usar las propiedades de hidrofobicidad para separar moléculas de entre sí. En este tipo de cromatografía, los grupos hidrofóbicos tales como, fenilo, octilo, hexilo o butilo, pueden formar la fase estacionaria de una columna. Moléculas tales como proteínas, péptidos y similares pasan a través de una columna de HIC (cromatografía interactiva hidrofóbica) que posee una o más regiones hidrofóbicas en su superficie o tienen paquetes hidrofóbicos y son capaces de interactuar con grupos hidrofóbicos que comprenden una fase estacionaria de HIC. Ejemplos de resinas o soportes de HIC incluyen Fenil sefarosa FF, Capto Fenilo (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), Fenilo 650-M (Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan) y Fenilo unido a Sartobind (Sartorius corporation, New York, USA).

Como se usa en la presente, el término “Cromatografía de Modo Mezclado” o “cromatografía multimodal” (ambas “MMC”) incluye un método cromatográfico en el cual los solutos interactúan con una fase estacionaria a través de más de un modo o mecanismo de interacción. La MMC puede ser usada como una herramienta complementaria o alternativa a cromatografía de fase inversa (RP), intercambio iónico (IEX) y fase normal (NP). Distinto de la cromatografía RP, NP e IEX, en la cual la interacción hidrofóbica, interacción hidrofílica e interacción iónica, respectivamente son los modos de interacción dominante, la cromatografía de modo mezclado puede emplear una combinación de dos o más de estos modos de interacción. Los medios de cromatografía en modo mezclado pueden proporcionar selectividad única que no puede ser reproducida por cromatografía de modo único. La cromatografía de modo mezclado también puede proporcionar ahorros de costo potencial, tiempos

de columna más largos y flexibilidad de operación comparado con métodos a base de afinidad. En algunas modalidades ejemplares, medios de cromatografía de modo mezclado pueden estar comprendidos de ligandos de modo mezclado acoplados a un soporte orgánico o inorgánico, algunas veces denotado una matriz de base, directamente o mediante un espaciador. El soporte puede estar en la forma de partículas, tal como partículas esencialmente esféricas, un monolito, filtro, membrana, superficie, capilares, *etc*. En algunas modalidades ejemplares, el soporte puede ser preparado a partir de un polímero nativo tal como material de carbohidrato reticulado, tal como agarosa, agPV, celulosa, dextrano, quitosán, konyac, carragenano, gelano, alginato, *etc*. Para obtener altas capacidades de adsorción, el soporte puede ser poroso y los ligandos son entonces acoplados a las superficies externas, así como también a las superficies porosas. Tales soportes poliméricos nativos pueden ser preparados de conformidad con los métodos estándares, tales como gelificación de suspensión inversa (S Hjerten: Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398 (1964), las enseñanzas completas de los cuales se incorporan en la presente por referencia). Alternativamente, el soporte puede ser preparado a partir de un polímero sintético tal como polímeros sintéticos reticulados, por ejemplo, estireno o derivados de estireno, divinilbenceno, acrilamidas, ésteres de acrilato, ésteres de metacrilato, ésteres de vinilo, vinilamidas y similares. Tales polímeros sintéticos se pueden producir de conformidad con métodos estándares, por ejemplo, “Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization” (R Arshady: Chimica e L′Industria 70(9), 70-75 (1988), las enseñanzas completas las cuales están incorporadas en la presente). Los soportes poliméricos sintéticos o nativos porosos también son disponibles de fuentes comerciales, tales como GE Healthcare, Uppsala, Sweden.

Como se usa en la presente, el término “espectrómetro de masas” incluye un dispositivo capaz de identificar especies moleculares específicas y medir sus masas exactas. El término significa incluir cualquier detector molecular en el cual un polipéptido o péptido puede ser caracterizado. Un espectrómetro de masas puede incluir tres partes principales: la fuente iónica, el analizador de masas, y el detector. La función de la fuente iónica es crear iones de fase gaseosa. Átomos de analito, moléculas, o grupos pueden ser transferidos en la fase gaseosa e ionizados ya sea concurrentemente (como en la ionización por electrorrocío) o a través de procesos separados. La elección de la fuente iónica depende de la aplicación. En algunas modalidades ejemplares, el espectrómetro de masas puede ser un espectrómetro de masas en serie. Como se usa en la presente, el término “espectrometría de masas en serie” incluye una técnica donde la información estructural en las moléculas de la muestra se obtiene usando etapas múltiples de selección de masas y separación de masas. Un prerrequisito es que las moléculas de muestra serán transformadas en una fase gaseosa e ionizada de manera que se forman fragmentos en una forma

predecible y controlable después de la primera etapa de selección de masas. La MS/MS de etapas múltiples, o MS^n, puede ser realizada seleccionando y aislando primero un ion precursor (MS^2), fragmentándolo, aislando un ion de fragmento primario (MS^3), fragmentándolo, aislando un fragmento secundario (MS^4), y así sucesivamente, en la medida en que se puede obtener información significante, o la señal iónica del fragmento es detectable. La MS en serie ha sido exitosamente analizada con una amplia variedad de combinaciones de analizador. Cuáles analizadores se combinan para formar una cierta aplicación se puede determinar por muchos factores diferentes, tales como sensibilidad, selectividad, y velocidad, pero también tamaño, costo, y disponibilidad. Las dos categorías mayores de métodos de MS en serie son serie en espacio y serie en tiempo, pero existen también híbridos donde los analizadores de serie en tiempo están acoplados en el espacio o con analizadores de serie en espacio. Un espectrómetro de masas de serie en espacio comprende una fuente iónica, un dispositivo de activación iónica precursor, y al menos dos analizadores de masa sin atrapamiento. Las funciones de separación de m/z específicas pueden ser designadas de manera que en una sección de los instrumentos los iones son seleccionados, disociados en una región intermedia, y los iones del producto son entonces transmitidos a otro analizador para separación de m/z y adquisición de datos. En serie en tiempo, los iones de los espectrómetros de masa producidos en la fuente iónica pueden ser atrapados, aislados, fragmentados, y separados m/z en el mismo dispositivo físico. Los péptidos identificados por el espectrómetro de masas pueden ser usados como representantes subrogados de la proteína intacta y sus modificaciones post-traduccionales. Pueden ser usados para caracterización de la proteína correlacionando datos de MS/MS experimentales y teóricos, el último generado a partir de péptidos posibles en una base de datos de secuencia de proteína. La caracterización incluye, pero no se limita a, la secuenciación de aminoácidos de los fragmentos de proteína, determinar el secuenciamiento de proteína, determinar el secuenciamiento de la proteína *de novo*, localizar modificaciones post-traduccionales, o identificar modificaciones post-traduccionales, o análisis de comparabilidad, o combinaciones de los mismos.

Como se usa en la presente, “Mini-Trampa” o “MiniTrampa” o “molécula que se une a una MiniTrampa” es capaz de unirse a una molécula de VEGF. Tales MiniTrampas pueden incluir (i) polipéptidos quiméricos, así como también (ii) moléculas multiméricas (*por ejemplo,* diméricas) que comprenden dos o más polipéptidos los cuales se unen no covalentemente, por ejemplo, por uno o más puentes de disulfuro. Las MiniTrampas se pueden producir a través de modificación química, actividad enzimática, o facturadas recombinantemente.

Como se usa en la presente, “MiniTrampa del VEGF” o “molécula de unión a la MiniTrampa del VEGF” puede ser una molécula o complejo de moléculas que se unen a VEGF y tiene una o más

series de dominios similares a Ig del receptor del VEGF (o variantes del mismo) (*por ejemplo,* dominio 2 de Ig del VEGFR1 y/o dominio 3 y/o 4 de Ig del VEGFR2) y un componente multimerizante ausente o modificado (MC), por ejemplo, en donde el MC es un Fc de inmunoglobulina modificado. La modificación puede ser el resultado de digestión proteolítica de una trampa del VEGF (*por ejemplo,* aflibercept o conbercept) o expresión directa de las cadenas de polipéptido resultantes con la secuencia MC acortada. (Véase la estructura molecular representada en la **Figura 1**). La **Figura 1** es una representación de una molécula de MiniTrampa del VEGF, la cual es el producto de proteólisis de aflibercept con IdeS de *Streptococcus pyogenes*. La molécula homodimérica es representada que tiene un fragmento de dominio de bisagra Ig conectado por dos enlaces disulfuro paralelos. El dominio del VEGFR1, el dominio del VEGFR2 y el fragmento del dominio de bisagra (MC) están indicados. El punto en aflibercept donde ocurre la escisión de IdeS está indicado con un "//". El fragmento Fc escindido a partir de aflibercept también está indicado. Un de tal polipéptido quimérico único, el cual no es dimerizado, también puede ser una MiniTrampa del VEGF si tiene actividad de unión al VEGF. El término "MiniTrampa del VEGF" incluye un polipéptido único que comprende una primera serie de uno o más dominios Ig del receptor VEGF (o variantes del mismo), que carece de un MC, pero se fusiona con un enlazador (*por ejemplo,* un enlazador peptídico) a una o más series adicionales de uno o más dominios Ig del receptor de VEGF (o variantes del mismo). Los dominios de unión al VEGF en una MiniTrampa del VEGF de la presente invención pueden ser idénticos o diferentes de entre sí (véase WO2005/00895, las enseñanzas completas de los cuales se incorporan en la presente por referencia).

Por ejemplo, en una modalidad de la invención, el dominio Fc de inmunoglobulina no modificada comprende la secuencia de aminoácido o aminoácidos 1-226 del mismo:

DKTHTCPX_1CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKX_2TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO.: 33; en donde X_1 es L o P y X_2 es A o T)

La inhibición del VEGF incluye, por ejemplo, antagonismo de la unión del VEGF al receptor del VEGF, por ejemplo, por competición con el vector del VEGF para la unión del VEGF (*por ejemplo,* $VEGF_{110}$, $VEGF_{121}$ y/o $VEGF_{165}$). Tal inhibición puede resultar en la inhibición de la actividad mediada por el VEGF del VEGFR, por ejemplo, inhibición de la expresión de luciferasa en una línea celular (*por ejemplo,* HEK293) que expresa el Receptor del VEGF quimérico (*por ejemplo,* un homodímero del mismo) que tiene dominios extracelulares del VEGFR fusionados a dominios intracelular de IL18Rα y/o IL18Rβ en la superficie celular y también que tiene un gen reportero de NFkB-luciferasa-

IRES-eGFP, por ejemplo, la línea celular HEK293/D9/Flt-IL18Rα/Flt-IL18Rβ como se expone en la presente.

Los componentes del dominio Ig del receptor del VEGF de las MiniTrampas del VEGF de la presente invención pueden incluir:

(i) uno o más del dominio 2 similar a inmunoglobulina (Ig) de VEGFR1 (Flt1) (R1D2),

(ii) uno o más del dominio Ig 3 del VEGFR2 (Flk1 o KDR) (Flk1D3) (R2D3),

(iii) uno o más del dominio Ig 4 del VEGFR2 (Flk1 o KDR) (Flk1D4) (R2D4) y/o

(iv) uno o más del dominio Ig 3 del VEGFR3 (Flt4) (Flt1D3 o R3D3).

Los dominios similares a inmunoglobulina de receptores del VEGF pueden referirse en la presente como dominios “Ig” del VEGFR. Los dominios Ig del VEGFR los cuales son referidos en la presente, por ejemplo, R1D2 (el cual puede ser referido en la presente como VEGFR1(d2)), R2D3 (el cual puede ser referido en la presente como VEGFR2(d3)), R2D4 (el cual puede ser referido en la presente como VEGFR2(d4)) y R3D3 (el cual puede ser referido en la presente como VEGFR3(d3)) están propuestos para abarcar no solamente el dominio Ig de tipo silvestre completo, sino también variantes del mismo las cuales retienen sustancialmente las características funcionales del dominio de tipo silvestre, por ejemplo, retienen la capacidad para formar un dominio de unión al VEGF de funcionamiento cuando se incorpora en una MiniTrampa del VEGF. Será fácilmente aparente para uno de habilidad en la técnica que numerosas variantes de los dominios Ig anteriores, los cuales retienen sustancialmente las mismas características de funcionalidad como el dominio de tipo silvestre, se pueden obtener.

La presente invención proporciona un polipéptido de MiniTrampa del VEGF que comprende la siguiente estructura de dominio:

- $((R1D2)\text{-}(R2D3))_a$-enlazador-$((R1D2)\text{-}(R2D3))_b$;
- $((R1D2)\text{-}(R2D3)\text{-}(R2D4))_c$-enlazador-$((R1D2)\text{-}(R2D3)\text{-}(R2D4))_d$;
- $((R1D2)\text{-}(R2D3))_e$-$(MC)_g$;
- $((R1D2)\text{-}(R2D3)\text{-}(R2D4))_f$-$(MC)_g$;

en donde,

– R1D2 es el dominio 2 (D2) de Ig del receptor 1 del VEGF (VEGFR1;

– R2D3 es el dominio 3 de Ig del VEGFR2;

– R2D4 es el dominio 4 de Ig del VEGFR2;

– MC es un componente multimerizante (*por ejemplo,* un dominio de bisagra IgG o fragmento del mismo, por ejemplo, de IgG1);

– enlazador es un péptido que comprende aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos, por ejemplo, $(GGGS)_g$ (SEQ ID NO.: 104);

e,

Independientemente,

a= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15;

b= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15;

c= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15;

d= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15;

e= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15;

f= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15; y

g= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.

En una modalidad de la invención, R1D2 comprende la secuencia de aminoácido: SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIID (SEQ ID NO.: 34). En un aspecto, el RID2 carece del SDT N-terminal.

En una modalidad de la invención, R1D2 comprende la secuencia de aminoácido: PFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQT (SEQ ID NO.: 35).

En una modalidad de la invención, R2D3 comprende la secuencia de aminoácido: VVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK (SEQ ID NO.: 36).

En una modalidad de la invención, R2D4 comprende la secuencia de aminoácido: PFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPGPG (SEQ ID NO.: 37).

En una modalidad de la invención, R2D4 comprende la secuencia de aminoácido: FVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPIKSEKQSHVVSLVVYVP (SEQ ID NO.: 38).

En una modalidad de la invención, un componente multimerizante (MC) para uso en una MiniTrampa del VEGF es un péptido, por ejemplo, una inmunoglobulina Fc modificada (*por ejemplo,* de una IgG1) la cual es capaz de unirse a otro componente multimerizante. En un aspecto, un MC es una inmunoglobulina Fc modificada que incluye la región de bisagra de inmunoglobulina. Por ejemplo, en una modalidad de la invención, un MC es un péptido que comprende una o más (*por ejemplo,* 1, 2, 3, 4, 5 o 6) cisteínas que son capaces de formar uno o más puentes de cisteína con cisteínas en otro MC, por ejemplo, DKTHTCPPC (SEQ ID NO.: 39), DKTHTCPPCPPC (SEQ ID NO.: 40), DKTHTCPPCPPCPPC (SEQ ID NO.: 41), DKTHTC$(PPC)_h$, en donde h es 1, 2, 3, 4, o 5 (SEQ ID NO.: 105), DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO.: 60), DKTHTCPLCPAPELLG (SEQ ID NO.: 43),

DKTHTC (SEQ ID NO.: 44) o DKTHTCPLCPAP (SEQ ID NO.: 45).

La presente invención también proporciona un polipéptido de MiniTque comprende la siguiente estructura de dominio:

(i) $(R1D2)_a$-$(R2D3)_b$-$(MC)_c$; o

(ii) $(R1D2)_a$-$(R2D3)_b$-$(R2D4)_c$-$(MC)_d$;

el cual puede ser homodimerizado con un segundo de tales polipéptidos, por ejemplo, por unión entre los MC de cada polipéptido,

en donde

(i) tales dominios R1D2 se coordinan;

(ii) tales dominios R1D3 se coordinan; y/o

(iii) tales dominios R1D4 se coordinan,

para formar un dominio de unión al VEGF dimérico.

En una modalidad de la invención, el polipéptido de MiniTrampa del VEGF comprende la secuencia de aminoácido:

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSP**N_{36}**ITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIS**N_{68}**ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVL**N_{123}**CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKK**N_{196}**STFVRVHEKDKTHTCPPC**PAPELLG** (SEQ ID NO.: 46; MC subrayado);

GRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHENLSVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPGPGDKTHTCPLCPAPELLG (SEQ ID NO.: 47; MC subrayado);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSP**N_{36}**ITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIS**N_{68}**ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVL**N_{123}**CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKK**N_{196}**STFVRVHEKDKTHTCPPC (SEQ ID NO.: 48; MC subrayado);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSP**N_{36}**ITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIS**N_{68}**ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVL**N_{123}**CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKK**N_{196}**STFVRVHEKDKTHTCPPC**PPC** (SEQ ID NO.: 49; MC subrayado);

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSP**N_{36}**ITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIS**N_{68}**ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVL**N_{123}**CTARTELNVGID

FNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKK**N_{196}**ST FVRVHEKDKTHTCPPC**PPCPPC** (SEQ ID NO.: 50; MC subrayado); o SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNAT YKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNW EYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVH EKDKTHTC-(PPC)x (MC subrayado; en donde x es 1, 2, 3, 4 o 5)(SEQ ID NO.: 106). Como se discute, tales polipéptidos pueden ser multimerizados (*por ejemplo,* dimerizados (*por ejemplo,* homodimerizados)) en donde el puente entre los polipéptidos es mediado mediante los componentes multimerizantes.

En una modalidad de la invención, el dominio 2 similar a Ig del VEGFR1 de las MiniTrampas del VEGF monoméricas de la presente invención, tienen glicosilación N-ligada a N36 y/o N68; y/o un puente de disulfuro intracadena entre C30 y C79; y/o, el dominio similar a Ig del VEGFR2 de las MiniTrampas del VEGF monoméricas de la presente invención, tienen glicosilación N-ligada en N123 y/o N196; y/o un puente de disulfuro intracadena entre C124 y C185.

En una modalidad de la invención, la MiniTrampa del VEGF comprende la estructura:

- $(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$-$(G_4S)_3$-$(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$ ("$(G_4S)_3$" descrito como SEQ ID NO.: 107);
- $(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$-$(G_4S)_6$-$(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$ ("$(G_4S)_6$" descrito como SEQ ID NO.: 108);
- $(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$-$(G_4S)_9$-$(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$ ("$(G_4S)_9$" descrito como SEQ ID NO.: 109); o
- $(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$-$(G_4S)_{12}$-$(R1D2)_1$-$(R2D3)_1$ ("$(G_4S)_{12}$" descrito como SEQ ID NO.: 110).

G_4S es -Gly-Gly-Gly-Gly-Ser- (SEQ ID NO.: 111).

En una modalidad de la invención, la MiniTrampa del VEGF comprende la secuencia de aminoácido:

(i)

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNAT YKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNW EYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVH EKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCR VTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTII DVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK (SEQ ID NO.: 51; enlazador subrayado);

(iii)

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNAT YKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNW EYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVH EKGGGGSGGGGSGGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLI

PDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTC AASSGLMTKKNSTFVRVHEK (SEQ ID NO.: 52; enlazador subrayado);

(iv)

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNAT YKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNW EYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVH EKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSDTGRPFVEMYS EIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATV NGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKL VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK (SEQ ID NO.: 53; enlazador subrayado)

(v)

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNAT YKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNW EYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVH EKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGI DFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTF VRVHEK (SEQ ID NO.: 54; enlazador subrayado);

o

(vi)

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNAT YKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNW EYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVH EK-(GGGGS)x -
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNAT YKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNW EYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVH EK (SEQ ID NO.: 112).

(en donde x es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15). Como se discute en la presente, estos polipéptidos pueden comprender una estructura secundaria en donde los dominios Ig del VEGFR similares se asocian para formar un dominio de unión del VEGF intra-cadena (*por ejemplo,* **Figura**

2). En una modalidad de la invención, dos o más de tales polipéptidos multimerizan (*por ejemplo,* dimerizan (*por ejemplo,* homodimerizan)) en donde los dominios Ig del VEGFR de cada cadena se asocian con dominios Ig similares de otra cadena para formar un dominio de unión del VEGF inter-cadena.

En una cierta modalidad de la invención, una MiniTrampa del VEGF de la presente invención carece de cualquier modificación significante de los residuos de aminoácido de un polipéptido de MiniTrampa del VEGF (*por ejemplo,* modificación química directa tal como PEGilación o yodoacetamidación, por ejemplo, en el N- y/o C-terminal).

En una modalidad de la invención, el polipéptido comprende una estructura secundaria en donde dominios Ig del VEGFR similares en un polipéptido quimérico único (*por ejemplo,* $(R1D2)_a$-$(R2D3)_b$-enlazador-$(R1D2)_c$-$(R2D3)_d$; o $(R1D2)_a$-$(R2D3)_b$-$(R2D4)_c$-enlazador-$(R1D2)_d$-$(R2D3)_e$-$(R2D4)_f$) o en polipéptidos quiméricos separados (*por ejemplo,* homodímeros) se coordinan para formar un dominio de unión al VEGF. Por ejemplo, en donde

(i) tales dominios R1D2 se coordinan;

(ii) tales dominios R2D3 se coordinan; y/o

(iii) tales dominios R2D4 se coordinan,

para formar un dominio de unión al VEGF. La **Figura 2** es una descripción de una MiniTrampa del VEGF de cadena única que representa tal coordinación del dominio. Los dominios del VEGFR1, VEGFR2 y enlazador están indicados. El enlazador mostrado es $(G_4S)_6$ (SEQ ID NO.: 108). La presente invención incluye MiniTrampas del VEGFs de cadena única con un enlazador $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO.: 107); $(G_4S)_9$ (SEQ ID NO.: 109) o $(G_4S)_{12}$ (SEQ ID NO.: 110).

Además, la presente invención también proporciona un complejo que comprende una MiniTrampa del VEGF como se discute en la presente complejada con un polipéptido del VEGF o un fragmento del mismo o fusión del mismo. En una modalidad de la invención, el VEGF (*por ejemplo,* $VEGF_{165}$) es homodimerizado y/o la MiniTrampa del VEGF es homodimerizada en un complejo 2:2 (2 VEGFs:2 MiniTrampas) y/o la MiniTrampa del VEGF es homodimerizada en un complejo 1:1. Los complejos pueden incluir moléculas del VEGF homodimerizadas unidas a polipéptidos de MiniTrampa del VEGF homodimerizados. En una modalidad de la invención, el complejo es *in vitro* (*por ejemplo,* inmovilizado a un sustrato sólido) o está en el cuerpo de un sujeto. La presente invención también incluye una composición de complejos de un dímero del VEGF (*por ejemplo,* $VEGF_{165}$) complejado con una MiniTrampa del VEGF.

Como se usa en la presente, el término “proteína” o “proteína de interés” puede incluir cualquier polímero de aminoácido que tiene enlaces amida covalentemente ligados. Ejemplos de proteínas de iSnterés incluyen, pero no se limitan a, aflibercept y MiniTrampa. Las proteínas comprenden una o

más cadenas poliméricas de aminoácido en general, conocidas en la técnica como “polipéptidos”. “Polipéptido” se refiere a un polímero compuesto de residuos de aminoácido, variantes estructurales que se originan naturalmente relacionadas, y análogos de los mismos que no se originan naturalmente sintéticos ligados mediante enlaces peptídicos. “Péptido o polipéptido sintético” se refiere a un péptido o polipéptido que no se origina naturalmente. Péptidos o polipéptidos sintéticos pueden ser sintetizados, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptido automatizado. Varios métodos de síntesis peptídica de fase sólida se conocen por aquellos de habilidad en la técnica. Una proteína puede comprender uno o más polipéptidos múltiples para formar una biomolécula de funcionamiento único. En otro aspecto ejemplar, una proteína puede incluir fragmentos de anticuerpo, nanocuerpos, quimeras de anticuerpo recombinantes, citocinas, quimiocinas, hormonas peptídicas, y similares. Las proteínas de interés pueden incluir cualquiera de las proteínas bio-terapéuticas, proteínas recombinantes usadas en la investigación o terapia, proteínas trampa y otras proteínas de fusión Fc del receptor quimérico, proteínas quiméricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, y anticuerpos biespecíficos. En un aspecto particular, la proteína de interés es una proteína de fusión anti-VEGF (*por ejemplo,* aflibercept o MiniTrampa). Las proteínas pueden ser producidas usando sistemas de producción a base de células recombinantes, tales como el sistema de baculovirus de insecto, sistemas de levadura (*por ejemplo, Pichia sp).*, y sistemas de mamífero (*por ejemplo,* células CHO y células CHO-K1 similares derivadas de CHO). Para una reciente revisión que discute proteínas bioterapéuticas y su producción, véase Ghaderi *et al*., “Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation”, (Darius Ghaderi *et al*., Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS 147–176 (2012), las enseñanzas completas de los cuales se incorporan en la presente por referencia). En algunas modalidades ejemplares, las proteínas comprenden modificaciones, aductos, y otras porciones covalentemente ligadas. Estas modificaciones, aductos y porciones incluyen, por ejemplo, avidina, estreptavidina, biotina, glicanos (*por ejemplo,* N-acetilgalactosamina, galactosa, ácido neuramínico, N-acetilglucosamina, fucosa, manosa, y otros monosacáridos), PEG, polihistidina, FLAGtag, proteína de unión a maltosa (MBP), proteína de unión a quitina (CBP), epítopo-myc de glutationa-S-transferasa (GST), etiquetas fluorescentes y otros tintes, y similares. Las proteínas pueden ser clasificadas con base en las composiciones y solubilidad y de este modo, incluyen proteínas simples tales como, proteínas globulares y proteínas fibrosas; proteínas conjugadas, tales como, nucleoproteínas, glicoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, fosfoproteínas, metaloproteínas, y lipoproteínas; y proteínas derivadas, tales como, proteínas derivadas primarias y

proteínas derivadas secundarias.

En algunas modalidades ejemplares, la proteína de interés puede ser una proteína recombinante, un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, fragmento de anticuerpo, anticuerpo monoclonal, proteína de fusión, scFv y combinaciones de los mismos.

Como se usa en la presente, el término “proteína recombinante” se refiere a una proteína producida como el resultado de la transcripción y traducción de un gen llevado en un vector de expresión recombinante que se ha introducido en una célula hospedera adecuada. En ciertas modalidades ejemplares, la proteína recombinante puede ser una proteína de fusión. En un aspecto particular, la proteína recombinante es una proteína de fusión anti-VEGF (*por ejemplo,* aflibercept o MiniTrampa). En ciertas modalidades ejemplares, la proteína recombinante puede ser un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado, o completamente humano. En ciertas modalidades ejemplares, la proteína recombinante puede ser un anticuerpo de un isotipo seleccionado a partir del grupo que consiste en: IgG, IgM, IgA1, IgA2, IgD, o IgE. En ciertas modalidades ejemplares la molécula de anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa (*por ejemplo,* una IgG1) o alternativamente el anticuerpo puede ser un fragmento (*por ejemplo,* un fragmento Fc o un fragmento Fab).

El término “anticuerpo”, como se usa en la presente incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como también multímeros de la misma (*por ejemplo,* IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (CL1). Las regiones de VH y VL pueden ser, además, subdivididas en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs), intercaladas con regiones que son más conservadas, llamadas regiones de armazón (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, arregladas del terminal amino al terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. En diferentes modalidades de la invención, las FRs del anticuerpo anti-big-ET-1 (o porción de unión al antígeno del mismo) puede ser idénticas a las secuencias de línea germinal humana o pueden ser naturalmente o artificialmente modificadas. Una secuencia consenso de aminoácido puede ser definida con base en un análisis lado por lado de dos o más CDRs. El término “anticuerpo”, como se usa en la presente, también incluye fragmentos de unión al antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Los términos “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo, “fragmento de

unión al antígeno” de un anticuerpo, y similares, como se usa en la presente, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína que se origina naturalmente, enzimáticamente obtenible, sintético, o diseñado por ingeniería genética, que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo pueden ser derivados, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas usando cualquiera de las técnicas estándares adecuadas tales como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinantes que involucran manipulación y expresión de dominios variables de anticuerpo que codifican a ADN y opcionalmente constantes. Tal ADN se conoce y/o es fácilmente disponible de, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (que incluyen, *por ejemplo,* bibliotecas de fago-anticuerpo), o pueden ser sintetizadas. El ADN puede ser secuenciado y manipulado químicamente o usando técnicas de biología molecular, por ejemplo, para arreglar uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o suprimir aminoácidos, *etc*.

Como se usa en la presente, un “fragmento de anticuerpo” incluye una porción de un anticuerpo intacto, tal como, por ejemplo, la región variable o de unión al antígeno de un anticuerpo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, un fragmento Fab, un fragmento Fab’, un fragmento F(ab’)2, un fragmento scFv, un fragmento Fv, un diacuerpo dsFv, un fragmento dAb, un fragmento Fd’, un fragmento Fd, y una región determinante de complementariedad aislada (CDR), así como también triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena única, y anticuerpos multi-específicos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Fragmentos Fv son la combinación de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, y proteínas ScFv son moléculas de polipéptido de cadena única recombinantes en las cuales las regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina están conectadas por un enlazador peptídico. En algunas modalidades ejemplares, un fragmento de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácido suficiente del anticuerpo precursor del cual es un fragmento que se une al mismo antígeno como lo hace el anticuerpo precursor; en algunas modalidades ejemplares, un fragmento se une al antígeno con una afinidad comparable con aquella del anticuerpo precursor y/o compite con el anticuerpo precursor para unión al antígeno. Un fragmento de anticuerpo puede ser producido por cualquier medio. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede ser enzimáticamente o químicamente producido por fragmentación de un anticuerpo intacto y/o puede ser recombinantemente producido a partir de un gen que codifica la secuencia de anticuerpo parcial. Alternativamente, o adicionalmente, un fragmento de anticuerpo puede ser completamente o parcialmente sintéticamente producido. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de cadena única de anticuerpo. Alternativamente,

o adicionalmente, un fragmento de anticuerpo puede comprender cadenas múltiples que están ligadas en conjunto, por ejemplo, por enlaces disulfuro. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un complejo multi-molecular. Un fragmento de anticuerpo funcional típicamente comprende al menos aproximadamente 50 aminoácidos y más típicamente comprende al menos aproximadamente 200 aminoácidos.

El término “anticuerpo biespecífico” incluye un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítopos. Anticuerpos biespecíficos en general, comprenden dos cadenas pesadas diferentes con cada cadena pesada que se une específicamente a diferente epítopo- ya sea en dos diferentes moléculas (*por ejemplo,* antígenos) o en la misma molécula (*por ejemplo,* en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos diferentes epítopos (un primer epítopo y un segundo epítopo), la afinidad de la primera cadena pesada para el primer epítopo en general será al menos una a dos a tres o cuatro órdenes de magnitud inferior que la afinidad de la primera cadena pesada del segundo epítopo, y *viceversa*. Los epítopos reconocidos por el anticuerpo biespecífico pueden estar en el mismo o un diferente objetivo (*por ejemplo,* en la misma o diferente proteína). Los anticuerpos biespecíficos pueden ser elaborados, por ejemplo, combinando cadenas pesadas que reconocen diferentes epítopos del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias variables de cadena pesada que reconocen diferentes epítopos del mismo antígeno pueden ser fusionadas a secuencias de ácido nucleico que codifican diferentes regiones constantes de cadena pesada y tales secuencias pueden ser expresadas en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina.

Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas que tiene cada una tres CDRs de cadena pesada, seguida por un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que ya sea no confiere especificidad de unión al antígeno, pero que puede asociarse con cada cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y que puede unirse a uno o más de los epítopos unidos por las regiones de unión al antígeno de cadena pesada, o que pueden asociarse con cada cadena pesada y permitir la unión de una o ambas de las cadenas pesadas a uno o ambos epítopos. Los BsAbs pueden ser divididos en dos clases principales, aquellas que portan una región Fc (similar a IgG) y aquellas que carecen de una región Fc, la última normalmente siendo más pequeña que las moléculas biespecíficas de IgG y similares a IgG que comprenden una Fc. Los bsAbs similares a IgG pueden tener diferentes formatos tales como, pero no limitados a, triomab, IgG de botones en (IgG kih), cruzadoMab, IgG orto-Fab, Ig de dominios variables duales (DVD-Ig), Fab de acción dual o dos en uno (DAF), Fv de cadena única-IgG (IgG-scFv), o cuerpos-κλ. Los formatos diferentes similares a no IgG incluyen scFvs en serie, formato de diacuerpo, diacuerpo de cadena única, diacuerpos en serie (TandAbs), molécula de

reobjetivo de afinidad dual (DART), DART-Fc, nanocuerpos, o anticuerpos producidos por el método anclaje y bloqueo (DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY 130; Dafne Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265–310 (2014), las enseñanzas completas de los cuales se incorporan en la presente por referencia). Los métodos para producir bsAbs no están limitados a tecnología de cuadroma basada en la fusión somática de dos diferentes líneas de células de hibridoma, conjugación química, la cual involucra reticuladores químicos, y procedimientos genéticos que utilizan tecnología de ADN recombinante. Ejemplos de bsAbs incluyen aquellos descritos en las siguientes solicitudes de patente, las cuales están de este modo incorporadas por referencia: Serie Estadounidense No. 12/823838, presentada el 25 de junio, 2010; Serie Estadounidense No. 13/ 488628, presentada el 5 de junio, 2012; Serie Estadounidense No. 14/031075, presentada el 19 de septiembre, 2013; Serie Estadounidense No. 14/808171, presentada el 24 de junio, 2015; Serie Estadounidense No. 15/713574, presentada el 22 de septiembre, 2017; Serie Estadounidense No. 15/713569, presentada el 22 de septiembre, 2017; Serie Estadounidense No. 15/386453, presentada el 21 de diciembre, 2016; Serie Estadounidense No. 15/386443, presentada el 21 de diciembre, 2016; Serie Estadounidense No. 15/22343 presentada el 29 de Julio, 2016; y Serie Estadounidense No. 15814095, presentada el 15 de noviembre, 2017. Bajos niveles de impurezas de homodímeros pueden estar presentes en varias etapas durante la manufacturación de anticuerpos biespecíficos. La detección de tales impurezas de homodímeros puede ser estimulada cuando es realizada usando análisis de masas intacto debido a bajas abundancias de las impurezas del homodímero y la co-elución de estas impurezas con especies principales se puede llevar a cabo usando un método cromatográfico líquido regular.

Como se usa en la presente “anticuerpo multiespecífico” se refiere a un anticuerpo con especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Mientras tales moléculas normalmente se unirán solamente a dos antígenos (*es decir,* anticuerpos biespecíficos, bsAbs), los anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpo triespecífico y KIH Triespecífico, también pueden ser atendidos por el sistema y método descrito en la presente.

El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente no está limitado a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. Un anticuerpo monoclonal puede ser derivado de un clon único, que incluye cualquier clon eucariótico, procariótico, o fago, por cualquiera de los medios disponibles o conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales útiles con la presente descripción pueden ser preparados usando una amplia variedad de técnicas conocidas en el arte que incluyen el uso tecnología de hibridoma, recombinante, y despliegue de fago, o una combinación de los mismos.

En algunas modalidades ejemplares, la proteína de interés puede tener un pI en el intervalo de aproximadamente 4.5 hasta aproximadamente 9.0. En una modalidad específica ejemplar, el pI puede ser de aproximadamente 4.5, aproximadamente 5.0, aproximadamente 5.5, aproximadamente 5.6, aproximadamente 5.7, aproximadamente 5.8, aproximadamente 5.9, aproximadamente 6.0, aproximadamente 6.1, aproximadamente 6.2, aproximadamente 6.3, aproximadamente 6.4, aproximadamente 6.5, aproximadamente 6.6, aproximadamente 6.7, aproximadamente 6.8, aproximadamente 6.9, aproximadamente 7.0, aproximadamente 7.1, aproximadamente 7.2, aproximadamente 7.3, aproximadamente 7.4, aproximadamente 7.5, aproximadamente 7.6, aproximadamente 7.7, aproximadamente 7.8, aproximadamente 7.9, aproximadamente 8.0, aproximadamente 8.1, aproximadamente 8.2, aproximadamente 8.3, aproximadamente 8.4, aproximadamente 8.5, aproximadamente 8.6, aproximadamente 8.7, aproximadamente 8.8, aproximadamente 8.9, o aproximadamente 9.0. En algunas modalidades ejemplares, los tipos de proteína de interés en las composiciones pueden ser más de uno.

En algunas modalidades ejemplares, la proteína de interés se puede producir de células de mamífero. Las células de mamífero pueden ser de origen humano o de origen no humano, pueden incluir células epiteliales primarias (*por ejemplo,* queratinocitos, células epiteliales cervicales, células epiteliales bronquiales, células epiteliales traqueales, células epiteliales renales y células epiteliales retinales), líneas de células establecidas y sus cepas (*por ejemplo,* células 293, células renales embriónicas, células BHK, células HeLa, células epiteliales cervicales y células PER-C6 retinales, células MDBK (NBL-1), células 911, células CRFK, células MDCK, células CHO, células BeWo, células Chang, células Detroit 562, células HeLa 229, células HeLa S3, células Hep-2, células KB, células LSI80, células LS174T, células NCI-H-548, células RPMI2650, células SW-13, células T24, células WI-28 VA13, 2RA, células WISH, células BS-C-I, células LLC-MK2, células Clon M-3, células 1-10, células RAG, células TCMK-1, células Y-l, células LLC-PKi, células PK(15), células GHi, células GH3, células L2, células LLC-RC 256, células MHiCi, células XC, células MDOK, células VSW, células B1 y TH-1, células BSC-1, células RAf, células RK-, células PK-15 o derivados de las mismas), células de fibroblasto de cualquier tejido u órgano (que incluye pero no se limita a corazón, hígado, riñón, colon, intestinos, esófago, estómago, tejido neural (cerebro, médula espinal), pulmón, tejido vascular (arteria, vena, capilar), tejido linfoide (glándula linfática, adenoide, amígdala, médula ósea, y sangre), bazo, y fibroblasto y líneas de células similares a fibroblasto (*por ejemplo,* células CHO, células TRG-2, células IMR-33, células Don, células GHK-21, células citrulinemia, células Dempsey, células Detroit 551, células Detroit 510, células Detroit 525, células Detroit 529, células Detroit 532, células Detroit 539, células Detroit 548, células Detroit 573, células HEL 299, células IMR-90, células MRC-5, células WI-38, células WI-26, células Midi, células CHO, células CV-1,

células COS-1, células COS-3, células COS-7, células Vero, células DBS-FrhL-2, células BALB/3T3, células F9, células SV-T2, células M-MSV-BALB/3T3, células K-BALB, células BLO-11, células NOR-10, células C3H/IOTI/2, células HSDMiC3, células KLN205, células McCoy, células L de Ratón, células Cepa 2071 (Mouse L), células cepa L-M (L de Ratón), células L-MTK' (L de Ratón), células NCTC clones 2472 y 2555, células SCC-PSA1, células Swiss/3T3, células muntjac Indias, células SIRC, células Cn, y células Jensen, células Sp2/0, NS0, células NS1 o derivados de las mismas).

Como se usa en la presente, el término “agente de alquilación de proteína” se refiere a un agente usado para alquilar ciertos residuos de aminoácido libres en una proteína. Ejemplos no limitantes de agentes de alquilación de proteína son yodoacetamida (IOA), cloroacetamida (CAA), acrilamida (AA), N-etilmaleimida (NEM), metanetiosulfonato de metilo (MMTS), y 4-vinilpiridina o combinaciones de los mismos.

Como se usa en la presente, “desnaturalización de la proteína” puede referirse a un proceso en el cual la forma tri-dimensional de una molécula se cambia a partir de su estado nativo. La desnaturalización de proteína puede llevarse a cabo usando un agente de desnaturalización de la proteína. Ejemplos no limitantes de un agente desnaturalizante de proteína incluyen calor, pH alto o bajo, agentes reductores como DTT (véase abajo) o exposición a agentes caotrópicos. Varios agentes caotrópicos pueden ser usados como agentes desnaturalizantes de la proteína. Solutos caotrópicos incrementan la entropía del sistema interfiriendo con interacciones moleculares mediadas por fuerzas no covalentes tales como enlaces de hidrógeno, fuerzas van der Waals, y efectos hidrofóbicos. Ejemplos no limitantes para agentes caotrópicos incluyen butanol, etanol, cloruro de guanidinio, perclorato de litio, acetato de litio, cloruro de magnesio, fenol, propanol, dodecilsulfato de sodio, tiourea, N-laurilsarcosina, urea, y sales de los mismos.

Como se usa en la presente, el término “agente reductor de proteína” se refiere al agente usado para reducción de puentes disulfuro en una proteína. Ejemplos no limitantes de agentes reductores de proteína usados para reducir la proteína son ditiotreitol (DTT), ß-mercaptoetanol, reactivo Ellman, clorhidrato de hidroxilamina, cianoborohidruro de sodio, clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP-HCl), o combinaciones de los mismos.

Como se usa en la presente, el término “variante” de un polipéptido (*por ejemplo,* de un dominio Ig del VEGFR) se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos aproximadamente 70-99.9% (*por ejemplo,* 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.9%) idéntica o similar a una secuencia de aminoácido nativa o de referencia de una proteína de interés. Una comparación de secuencia puede ser realizada mediante, por ejemplo, un algoritmo BLAST en donde los parámetros del algoritmo se seleccionan para dar el apareamiento más grande entre las secuencias respectivas

sobre la longitud completa de las secuencias de referencia respectivas (*por ejemplo,* umbral esperado: 10; tamaño de palabra: 3; apareamientos máximos en un rango de interrogación: 0; matriz BLOSUM 62; costos de hueco: existencia 11, extensión 1; ajuste de matriz de registro de composición condicional). Variantes de un polipéptido (*por ejemplo,* de un dominio Ig del VEGFR) también pueden referirse a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido de referencia excepto por una o más (*por ejemplo,* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) mutaciones tales como, por ejemplo, mutaciones en sentido erróneo (*por ejemplo,* sustituciones conservadoras), mutaciones sin sentido, supresiones o inserciones. Las siguientes referencias se refieren a algoritmos BLAST a menudo usados para análisis de secuencia: BLAST ALGORITHMS: Altschul *et al.* (2005) FEBS J. 272(20): 5101-5109; Altschul, S. F., *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., *et al.*, (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T. L., *et al.*, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S. F., *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., *et al.*, (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J. C., *et al.*, (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J. M. *et al.*, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M. O., *et al.*, “A model of evolutionary change in proteins”. en Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M. O. Dayhoff (ed)., pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Lavarton, D.C.; Schwartz, R. M., *et al.*, “Matrices for detecting distant relationships”. en Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3.'' M. O. Dayhoff (ed)., pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Lavarton, D.C.; Altschul, S. F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D. J., *et al.*, (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S. F., *et al.*, (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin, S., *et al.*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., *et al.*, (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; y Altschul, S. F. “Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments”. en Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed)., (1997) pp. 1-14, Plenum, N.Y.; las enseñanzas completas de los cuales se incorporan en la presente por referencia.

Algunas variantes pueden ser modificaciones covalentes que sufren los polipéptidos, ya sea durante (modificación co-traduccional) o después (modificación post-traduccional “PTM”) de su síntesis ribosomal. Las PTMs son en general introducidas por enzimas específicas o trayectorias enzimáticas. Muchas ocurren en el sitio de una secuencia de proteína característica (*por ejemplo,* secuencia de firma) dentro del esqueleto de la proteína. Varios cientos de PTMs se han registrado y estas modificaciones influencian invariablemente algún aspecto de una estructura o función de la proteína por Wiley and Sons, Ltd., ISBN: 9780470669853, las enseñanzas completas de los cuales se incorporan en la presente por referencia). En ciertas modalidades ejemplares, una composición

de proteína puede comprender más de un tipo de variante de proteína de una proteína de interés.

Variantes de proteína en el caso de aflibercept (y proteínas que comparten características estructurales de aflibercept, por ejemplo, uno o más regiones de cadena pesada o ligera de aflibercept) pueden comprender, pero no se limitan a, variantes de oxidación las cuales pueden resultar de la oxidación de uno o más residuos de aminoácidos que se originan en, por ejemplo, residuos de histidina, cisteína, metionina, triptofano, fenilalanina y/o tirosina; variantes de desamidación las cuales pueden resultar de la desamidación en residuos de asparagina y/o desoxiglucosonación en residuos de asparagina.

Con respecto a aflibercept (y proteínas que comparten características estructurales de aflibercept por ejemplo, una o más regiones de cadena pesada o ligera de aflibercept), las variantes de oxidación pueden comprender oxidación del residuo de histidina en His86, His110, His145, His209, His95, His19 y/o His203 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); oxidación de residuos de triptofano en Trp58 y/o Trp138 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); oxidación de residuos de tirosina en Tyr64 (o posiciones equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); oxidación de residuos de fenilalanina en Phe44 y/o Phe166 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); y/u oxidación de residuos de metionina en Met10, Met20, Met163 y/o Met192 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept).

Con respecto a aflibercept (y proteínas que comparten características estructurales de aflibercept, por ejemplo, una o más regiones de cadena pesada o ligera de aflibercept) las variantes de desamidación pueden comprender desamidación del residuo de asparagina en Asn84 y/o Asn99 (o posiciones de resido equivalentes en las proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept).

Con respecto a aflibercept (y proteínas que comparten características estructurales de aflibercept, por ejemplo, una o más regiones de cadena pesada o ligera de aflibercept) la variante de desoxiglucosonación puede comprender 3-desoxiglucosonación del residuo de arginina en Arg5 (o posición de residuo equivalente en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept).

Variantes de proteína pueden incluir tanto especies acídicas como especies básicas. Las especies acídicas son típicamente las variantes que eluyen antes que el pico principal de CEX o después que el pico principal de AEX, mientras las especies básicas son las variantes que eluyen después que el pico principal de CEX o antes que el pico principal de AEX.

Como se usa en la presente, los términos “especies acídicas”, “AS”, “región acídica”, y “AR”, se refieren a las variantes de una proteína las cuales son caracterizadas por una carga acídica total. Por ejemplo, en las preparaciones de proteína recombinante tales especies acídicas pueden ser detectadas por varios métodos, tal como intercambio iónico, por ejemplo, HPLC WCX-10 (una cromatografía de intercambio catiónico débil), o IEF (enfoque isoeléctrico). Especies acídicas de un anticuerpo pueden incluir variantes, variantes de estructura, y/o variantes de fragmentación. Variantes ejemplares pueden incluir, pero no se limitan a, variantes de desamidación, variantes de afucosilación, variantes de oxidación, variantes de metilglioxal (MGO), variantes de glicación, y variantes de ácido cítrico. Variantes de estructura ejemplares incluyen, pero no se limitan a, variantes de glicosilación y variantes de acetonación. Las variantes de fragmentación ejemplar incluyen cualquiera de las especies de proteína modificadas a partir de la molécula objetivo debido a la disociación de la cadena peptídica, modificaciones enzimáticas y/o químicas, que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fc y Fab, fragmentos que pierden un Fab, fragmentos que pierden un dominio variable de cadena pesada, variantes de truncación C-terminal, variantes con escisión de Asp N-terminal en la cadena ligera, y variantes que tienen truncación N-terminal de la cadena ligera. Otras variantes de especies acídicas incluyen variantes que comprenden disulfuros no apareados, proteínas de células hospederas, y ácidos nucleicos hospederos, materiales cromatográficos, y componentes del medio. Comúnmente, las especies acídicas eluyen antes que el pico principal durante CEX o después que el pico principal durante el análisis de AEX (*Véase* **Figuras 16 y 17**).

En ciertas modalidades, una composición de proteína puede comprender más de un tipo de variante de especies acídicas. Por ejemplo, pero no por medio de limitación, las especies acídicas totales pueden ser categorizadas con base en el tiempo de retención cromatográfico de la aparición de picos. Otro ejemplo en el cual las especies acídicas totales pueden ser categorizadas se puede basar en el tipo de variante - variantes, variantes de estructura, o variante de fragmentación.

El término “especies acídicas” o “AS” no se refiere a impurezas relacionadas al proceso. El término “impureza relacionada al proceso”, como se usa en la presente, se refiere a impurezas que están presentes en una composición que comprende una proteína, pero no se derivan de la proteína misma. Las impurezas relacionadas al proceso incluyen, pero no se limitan a, proteínas de célula hospedera (HCPs), ácidos nucleicos de célula hospedera, materiales cromatográficos, y componentes del medio.

En una modalidad ejemplar, la cantidad de especies acídicas en la composición anti-VEGF comparada con la proteína de interés puede ser a lo sumo aproximadamente 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.9%, 1.8%, 1.7%, 1.6%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, o 0.0%

y varía dentro de uno o más de los precedentes. Ejemplos de composiciones anti-VEGF se discuten en la Sección III abajo. En un aspecto, la composición anti-VEGF puede comprender una proteína anti-VEGF seleccionada a partir del grupo que consiste en aflibercept, MiniTrampa recombinante (ejemplos de los cuales se describen en Patente Estadounidense No. 7,279,159), una scFv y otras proteínas anti-VEGF. En un aspecto preferido, la proteína recombinante de interés es aflibercept.

Entre las trayectorias de degradación química responsables de las especies acídicas o básicas, las dos modificaciones covalentes comúnmente observadas que ocurren en proteínas y péptidos son desaminación y oxidación. La metionina, cisteína, histidina, triptofano, y tirosina son algunos de los aminoácidos que son más susceptibles a oxidación: Met y Cys debido a que sus átomos de azufre e His, Trp, y Tyr debido a sus anillos aromáticos.

Como se usa en la presente, los términos “especies oxidativas”, “OS”, o “variante de oxidación”, se refieren a las variantes de una proteína formada por oxidación. Tales especies oxidativas también pueden ser seleccionadas por varios métodos, tales como intercambio iónico, por ejemplo, HPLC WCX-10 (una cromatografía de intercambio catiónico débil), o IEF (enfoque isoeléctrico). Las variantes de oxidación pueden resultar de la oxidación que se origina en residuos de histidina, cisteína, metionina, triptofano, fenilalanina y/o tirosina. Con respecto, en particular, a aflibercept (y proteínas que comparten características estructurales de aflibercept *por ejemplo,* una o más regiones de cadena ligera o pesada de aflibercept), las variantes de oxidación pueden comprender oxidación del residuo de histidina en His86, His110, His145, His209, His95, His19 y/o His203 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); oxidación de residuos de triptofano en Trp58 y/o Trp138 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); oxidación de residuos de tirosina en Tyr64 (o posiciones equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); oxidación de residuos de fenilalanina en Phe44 y/o Phe166 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); y/u oxidación de residuos de metionina en Met10, Met 20, Met163 y/o Met192 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept).

En una modalidad ejemplar, la cantidad de especies oxidativas en la composición anti-VEGF comparada con la proteína de interés puede ser a lo sumo aproximadamente 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.9%, 1.8%, 1.7%, 1.6%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, o 0.0% y varía dentro de uno o más de los precedentes. Ejemplos de composiciones anti-VEGF se discuten en la Sección III abajo. En un aspecto, la composición anti-VEGF puede comprender una proteína

anti-VEGF seleccionada a partir del grupo que consiste en aflibercept, MiniTrampa recombinante (ejemplos de los cuales se describen en la Patente Estadounidense No. 7,279,159), un scFv y otras proteínas anti-VEGF. En un aspecto preferido, la proteína recombinante de interés es aflibercept o MiniTrampa.

Los residuos de cisteína pueden sufrir oxidación espontánea para formar ya sea enlaces disulfuro intra- o intermoleculares o subproductos monomoleculares tales como ácido sulfénico.

Los residuos de histidina son también altamente sensibles a oxidación a través de la reacción con sus anillos de imidazol, los cuales pueden generar subsecuentemente especies de hidroxilo adicionales (Li, S, C Schoneich, and RT. Borchardt. 1995. Chemical Instability of Protein Pharmaceuticals: Mechanisms of Oxidation and Strategies for Stabilization. Biotechnol. Bioeng. 48:490-500, las enseñanzas completas de la cual se incorporan en la presente). Mecanismos propuestos para oxidación de histidina son resaltados en la **Figura 2** y **Figura 3**. Estudios mecanísticos detallados están disponibles en Anal. Chem. 2014, 86, 4940-4948 y J. Pharm. Biomed. Anal. 21 (2000) 1093-1097, las enseñanzas completas de los cuales se incorporan en la presente.

La oxidación de metionina puede conducir a la formación de sulfóxido de metionina (Li, S, C Schoneich, and RT. Borchardt. 1995. Chemical Instability of Protein Pharmaceuticals: Mechanisms of Oxidation and Strategies for Stabilization. Biotechnol. Bioeng. 48:490-500). Los varios mecanismos de oxidación posibles de los residuos de metionina se han discutido en la literatura (Brot, N., Weissbach, H. 1982. The biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. Trends Biochem. Sci. 7: 137-139, las enseñanzas completas de la cual se incorporan en la presente).

La oxidación de triptofano puede dar una mezcla compleja de productos. Los productos primarios pueden ser N-formilcinurenina y cinurenina junto con productos de mono-oxidación, di-oxidación y/o tri-oxidación (**Figura 4**). Los péptidos que portan modificaciones de Trp oxidadas en general, presentan incrementos de masa de 4, 16, 32 y 48 Da, que corresponden a la formación de cinurenina (KYN), hidroxitriptofano (W_{ox1}), y N-formilcinurenina/dihidroxitriptofano (NFK/W_{ox2}, referido también como “Trp doblemente oxidado”), trihidroxitriptofano (W_{ox3}, referido también como “Trp triplemento oxidado”), y sus combinaciones, tales como hidroxicinurenina (KYN_{ox1}, +20 Da). La oxidación a hidroxitriptofano (W_{ox1}) se ha discutido en la literatura (Mass spectrometric identification of oxidative modifications of triptofano residuos in proteins: chemical artifact o post-translational modification? J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2010 jul; 21(7): 1114–1117, las enseñanzas completas de la cual se incorporan en la presente). La oxidación de triptofano, pero no metionina y oxidación de histidina se ha encontrado que produce un cambio de color en los productos de proteína (Characterization of the Degradation Products of a Color-Changed Monoclonal Antibody: Triptofano-Derived Chromophores. dx.doi.org/10.1021/ac404218t | Anal. Chem. 2014, 86, 6850−6857). Similar al triptofano, la oxidación

de tirosina principalmente proporciona 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y ditirosina (Li, S, C Schoneich, and RT. Borchardt. 1995. Chemical Instability of Protein Pharmaceuticals: Mechanisms of Oxidation and Strategies for Stabilization. Biotechnol. Bioeng. 48:490-500).

Como se usa en la presente, los términos “especies básicas”, “región básica”, y “BR” se refieren a las variantes de una proteína, por ejemplo, un anticuerpo o porción del mismo de unión al antígeno, los cuales son caracterizados por una carga básica total, con relación a las especies variantes de carga primaria presentes dentro de la proteína. Por ejemplo, en preparaciones de proteína recombinante, tales especies básicas pueden ser detectadas por varios métodos, tales como intercambio iónico, por ejemplo, HPLC WCX-10 (una cromatografía de intercambio catiónico débil), o IEF (enfoque isoeléctrico). Las variantes ejemplares pueden incluir, pero no se limitan a, variantes de lisina, isomerización de ácido aspártico, formación de succinimida en asparagina, oxidación de metionina, amidación, formación incompleta de enlace disulfuro, mutación de serina a arginina, aglicosilación, fragmentación y agregación. Comúnmente, las especies básicas eluyen después que el pico principal durante CEX o antes que el pico principal durante el análisis de AEX. (Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies. MAbs. 2012 Sep 1; 4(5): 578–585. doi: 10.4161/mabs.21328, las enseñanzas completas de la cual se incorporan en la presente).

En ciertas modalidades, una composición de proteína puede comprender más de un tipo de variantes de especies básicas. Por ejemplo, pero no por medio de limitación, las especies básicas totales pueden ser divididas con base en el tiempo de retención cromatográfica de los picos que aparecen. Otro ejemplo en el cual las especies básicas totales pueden ser divididas se puede basar en el tipo de variante - variantes, variantes de estructura, o variante de fragmentación.

Como se discute para especies acídicas, el término “especies básicas” no incluye especies relacionadas al proceso y las especies básicas pueden ser el resultado de la preparación del producto (referido en la presente como “especies básicas derivadas de la preparación”), o el resultado de almacenamiento (referido en la presente como “especies básicas derivadas del almacenamiento”).

En una modalidad ejemplar, la cantidad de especies básicas en la composición anti-VEGF comparada con la proteína de interés puede ser a lo sumo aproximadamente 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.9%, 1.8%, 1.7%, 1.6%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, o 0.0% y varía dentro de uno o más de los precedentes. Ejemplos de las composiciones anti-VEGF se discuten en la Sección III abajo. En un aspecto, la composición anti-VEGF puede comprender una proteína anti-VEGF seleccionada a partir del grupo que consiste en aflibercept, MiniTrampa

recombinante (ejemplos de los cuales se describen en Patente Estadounidense No. 7,279,159), un scFv y otras proteínas anti-VEGF. En un aspecto preferido, la proteína recombinante de interés es aflibercept.

Como se usa en la presente, “matriz de muestra” o “muestra biológica” se puede obtener a partir de cualquier etapa del bioproceso, tal como, fluido de cultivo celular (CCF), fluido de cultivo celular recolectado (HCCF), cualquier etapa en el procesamiento en dirección descendente, sustancia de fármaco (DS), o un producto de fármaco (DP) que comprende el producto final formulado. En algunas otras modalidades ejemplares específicas, la muestra biológica puede ser seleccionada a partir de cualquier etapa del proceso en dirección descendente de clarificación, producción cromatográfica, inactivación viral, o filtración. En algunas modalidades ejemplares específicas, el producto de fármaco puede ser seleccionado a partir del producto de fármaco manufacturado en la clínica, transportación, almacenaje, o manipulación.

Como se usa en la presente, el término “sujeto” se refiere a un mamífero (*por ejemplo,* rata, ratón, perro, gato, vaca, oveja, caballo, cabra, conejo), preferiblemente un humano en necesidad de prevención y/o tratamiento de un cáncer o un trastorno ocular angiogénico. El sujeto puede tener cáncer o trastorno ocular angiogénico o estar predispuesto a desarrollar cáncer o trastorno ocular angiogénico.

En términos de formulación de proteína, el término “estable”, como se usa en la presente se refiere a la proteína de interés dentro de la formulación que es capaz de retener un grado aceptable de estructura química o función biológica después del almacenamiento bajo condiciones ejemplares definidas en la presente. Una formulación puede ser estable aún a pesar de que la proteína de interés contenida en esta no mantiene 100% de su estructura química o función biológica después del almacenamiento por una cantidad de tiempo definida. Bajo ciertas circunstancias, el mantenimiento de aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% o aproximadamente 99% de una estructura o función de la proteína después del almacenamiento por una cantidad definida de tiempo puede ser considerado como “estable”.

El término “trata” o “tratamiento” se refiere a una medición terapéutica que invierte, estabiliza o elimina una enfermedad o trastorno indeseado (*por ejemplo,* un trastorno ocular angiogénico o cáncer), por ejemplo, causando la regresión, estabilización o eliminación de uno o más síntomas o indicios de tal enfermedad o trastorno por cualquier grado clínicamente medible, por ejemplo, con respecto a un trastorno ocular angiogénico, causando una reducción en, o el mantenimiento de registro de severidad de retinopatía diabética (DRSS), por mejoramiento o mantenimiento de la visión (*por ejemplo,* en agudeza visual mejor corregida, por ejemplo, como se mide por un

incremento en las letras ETDRS), incremento o mantenimiento del campo visual y/o reducción o mantenimiento del grosor retinal central y, con respecto a cáncer, detención o inversión del crecimiento, supervivencia y/o metástasis de células de cáncer en el sujeto. Típicamente, la medición terapéutica es administración de una o más dosis de una cantidad terapéuticamente efectiva de MiniTrampa del VEGF al sujeto con la enfermedad o trastorno.

Como se usa en la presente, el término “tecnología de proceso en dirección ascendente”, en el contexto de preparación de proteína, se refiere a actividades que involucran la producción y recolección de proteínas a partir de células durante o después del cultivo celular de una proteína de interés. Como se usa en la presente, el término “cultivo celular” se refiere a métodos para generar y mantener una población de células hospederas capaz de producir una proteína recombinante de interés, así como también los métodos y técnicas para optimizar la producción y recolección de la proteína de interés. Por ejemplo, una vez que un vector de expresión se ha incorporado en una célula hospedera apropiada, la célula hospedera se puede mantener bajo condiciones adecuadas para expresión de las secuencias codificantes de nucleótido relevantes, y la recolección y producción de la proteína recombinante deseada.

Cuando se usan las técnicas de cultivo celular de la presente invención, una proteína de interés se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o directamente secretada en el medio. En modalidades donde la proteína de interés se produce intracelularmente, desechos particulados - ya sea células hospederas o células lisadas (*por ejemplo,* que resultan de la homogeneización) pueden ser removidos por una variedad de medios, que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación o ultrafiltración. Donde la proteína de interés se selecciona en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión pueden ser concentrados primero usando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, usando una unidad de ultrafiltración Amicon™ o Millipore Pellicon™. En un aspecto, la proteína de interés puede ser recolectada por centrifugación seguida por filtración profunda y después cromatografía de afinidad de captura.

Como se usa en la presente, un “antagonista del VEGF” es cualquier proteína o péptido que se une a, o interactúa con VEGF. Típicamente, esta unión para, o que interactúa con, inhibe la unión del VEGF a sus receptores (VEGFR1 y VEGFR2), y/o inhibe la señalización biológica y actividad del VEGF. Los antagonistas del VEGF incluyen moléculas las cuales interfieren con la interacción entre el VEGF y un receptor del VEGF natural, por ejemplo, las moléculas las cuales se unen al VEGF o un receptor del VEGF y previenen o de otro modo obstaculizan la interacción entre el VEGF y un receptor del VEGF. Antagonistas del VEGF ejemplares específicos incluyen anticuerpos anti-VEGF (*por ejemplo,* ranibizumab [LUCENTIS®]), anticuerpos del receptor anti-VEGF (*por ejemplo,* anticuerpos anti-VEGFR1, anticuerpos anti-VEGFR2 y similares), y moléculas quiméricas a base del

receptor del VEGF o proteínas de fusión que inhiben el VEGF (también referido en la presente como “VEGF-Trampas” o “MiniTrampas del VEGF”), tales como aflibercept, ziv-aflibercept y una proteína que tiene un aminoácido que tiene SEQ ID NO.: 60. Otros ejemplos de VEGF-Trampas son ALT-L9, M710, FYB203 y CHS-2020. Ejemplos adicionales de VEGF-Trampas se pueden encontrar en las Patentes Estadounidenses Nos. 7,070,959; 7,306,799; 7,374,757; 7,374,758; 7,531,173; 7,608,261; 5,952,199; 6,100,071; 6,383,486; 6,897,294 & 7,771,721, las cuales son específicamente incorporadas en la presente por referencia en su totalidad.

Moléculas quiméricas a base del receptor del VEGF incluyen polipéptidos quiméricos los cuales comprenden dos o más dominios similares a inmunoglobulina (Ig) de un vector del VEGF tal como VEGFR1 (también referido como Flt1) y/o VEGFR2 (también referido como Flk1 o KDR), y también puede comprender un dominio multimerizante (*por ejemplo,* un dominio Fc el cual facilita la multimerización [*por ejemplo,* dimerización] de dos o más polipéptidos quiméricos). Una molécula quimérica a base del receptor del VEGF ejemplar es una molécula referida como VEGFR1R2-FcΔC1(a) (también conocido como aflibercept; comercializadas bajo el nombre del producto EYLEA®). En ciertas modalidades ejemplares, aflibercept comprende la secuencia de aminoácido expuesta como

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNAT
YKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNW
EYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVH
EKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK. (SEQ ID NO.: 55)

Como se usa en la presente, “filtración viral” puede incluir filtración usando filtros adecuados que incluyen, pero no se limitan a, filtros Planova 20N™, 50 N o BioEx de Asahi Kasei Pharma, filtros Viresolve™ de EMD Millipore, filtro ViroSart CPV de Sartorius, o filtro Ultipor DV20 o filtro DV50™ de Pall Corporation. Será aparente para uno de habilidad ordinaria en la técnica seleccionar el filtro adecuado para obtener el desempeño de filtración deseado.

II. Determinación de Color

Como se usa en la presente, el color observado durante la producción de una proteína recombinante, específicamente, una proteína anti-VEGF, puede ser medido por varios métodos. Ejemplos no limitantes incluyen usar el número de color de yodo, número de color hazen, número de color gardner, número de color lovibond, número de color Saybolt, número de color de aceite mineral,

número de color de la Farmacopea Europea, número de color de la farmacopea US, CIE L*, a*, b* (o CIELAB), número de color Klett, número de color Hess-Ives, el índice de amarillamiento, número de color ADMI, y números de color de cervecería ASBC y EBC. Detalles en tales escalas se pueden encontrar en el Reporte de Solicitud No. 3.9 e por Lange, las enseñanzas completas del cual se incorporan en la presente.

La coincidencia de color visual con base en la Farmacopea Europea (Ph Eur) (European Color Standars, véase European Pharmacopoeia. Chapter 2.2.2. Degree of coloration of liquids. 8th ed. EP, las enseñanzas completas de la cual se incorporan en la presente) puede incluir preparar una solución de referencia de color como se describe en la Ph. Eur. (EP 2.2.2. Degree of Coloration of Liquids 2) - tres soluciones precursoras para colores rojo (cloruro de cobalto (II), amarillo (cloruro ferroso (III), y azul (sulfato cuproso (II), y 1% de ácido clorhídrico, cinco soluciones de referencia de color para tonos amarillo (Y), amarillo-verdoso (GY), amarillo-marrón (BY), marrón (B) y rojo (R), son preparados. Con estas cinco soluciones de referencia en turno, un total de treinta y siete soluciones de referencia de color son preparadas (Y1-Y7, GY1-GY7, BY1-BY7, B1-B9 y R1-R7). Cada una de la solución de referencia es claramente definida en el espacio de color CIE-Lab, por ejemplo, por luminosidad, tono y croma. De los siete estándares amarillo-marrón (estándares BY), BY1 es el estándar más oscuro y BY7 es el menos oscuro. La coincidencia en una muestra dada con aquella de un estándar de color BY se hace típicamente bajo luz de día difusa. Las composiciones de los estándares europeos de color amarillo-marrón se describen en la **Tabla 1**, abajo.

Tabla 1. Composición de los Estándares Europeos de Marrón-Amarillo

Solución de Referencia	**Volúmenes en mL**	
	Solución Estándar BY	**Ácido clorhídrico (10g/1 HCl)**
BY1	100.0	0.0
BY2	75.0	25.0
BY3	50.0	50.0
BY4	25.0	75.0
BY5	12.5	87.5
BY6	5.0	95.0
BY7	2.5	97.5

Solución Estándar Amarillo-Marrón (BY): 10.8g/L $FeCl_3.6H_2O$, 6.0g/L $CoCl_2.6H_2O$ y 2.5g/L $CuSO_4.5H_2O$

La prueba para color de líquidos se lleva a cabo comparando una solución de prueba con una solución de color estándar. La composición de la solución de color estándar se selecciona

dependiendo del tono e intensidad del color de la solución de prueba. Típicamente, la comparación se lleva a cabo en tubos de fondo plano de vidrio incoloro, transparente, neutral, que son igualados tan cercanamente como sea posible en diámetro interno y en todos los otros respectos (*por ejemplo,* tubos de aproximadamente 12, 15, 16 o 25 mm de diámetro). Por ejemplo, una comparación puede ser entre 2 o 10 mL de la solución de prueba y la solución de color estándar. La profundidad de los líquidos, por ejemplo, puede ser de aproximadamente 15, 25, 40 o 50 mm. El color asignado a la solución de prueba no debe ser más intenso que aquel del color estándar. Las comparaciones de color típicamente se llevan a cabo en luz difusa (*por ejemplo,* luz de día) contra un antecedente blanco. Los colores pueden ser comparados debajo del eje vertical o eje horizontal de los tubos.

Contrario a la medición de color EP, el Color 1061 de Monografía USP - Medición de Instrumental referencia el uso de la medición de color CIE L*, a*, b* (o CIELAB) para cuantificar los colores precisamente y objetivamente. Un total de veinte soluciones de referencia de color (identificado secuencialmente por las letras A hasta T) se definen en la Farmacopea Estadounidense. El color de la muestra medida está correlacionado automáticamente a las soluciones de referencia de color. Esto significa que se presenta la solución de referencia de color que es más cercana a la muestra (*es decir,* la solución de referencia con la diferencia más pequeña de color ΔE* al color de la muestra). Los valores ΔL*, Δa* y Δb* proporcionan las diferencias cuantitativas entre los valores L*, a* y b* de la muestra y aquellos de las soluciones USP presentadas. En el sistema de coordenadas de CIE L*a*b*, L* representa el grado de iluminación de un color en una escala de 0–100, con 0 siendo el más oscuro y 100 el más claro, a* representa el color más rojo o color más verde de un color (valores positivos de a* representan rojo, mientras valores negativos de a* representan verde), y b* representa el color más amarillo o más azul de una muestra, con valores positivos de b* que representan amarillo y valores negativos de b* que representan azul. La diferencia de color de un estándar, o de una muestra inicial en una evaluación, puede ser representada por un cambio en los componentes de color individuales ΔL*, Δa*, y Δb*. El cambio del compuesto, o diferencia en color, puede ser calculado como una distancia en espacio Euclidiana simple usando la fórmula: $\mathrm{d}E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$. Las coordenadas de color CIE L*, a*, b* pueden ser generadas, por ejemplo, usando el Hunter Labs UltrascanPro (Hunter Associates Laboratory, Reston, Virginia) o en el BYK Gardner LCS IV (BYK-Gardner, Columbia, Maryland). Para el Hunter Labs UltraScan Pro, la Prueba de Filtro Didymium puede ser ejecutada para calibración de longitud de onda. El instrumento puede ser estandarizado en TTRAN con el inserto de puerto de 1.98 cm (0.780 pulgadas) y DIW antes del uso; de este modo, estableciendo la parte superior (L = 100) e inferior (L = 0) de la escala fotométrica usando una trampa de luz y tarjeta negra. *Véase* Pack *et al.*, Modernization of Physical Appearance and Solution Color Tests Using Quantitative Tristimulus

Colorimetry: Advantages, Harmonization, and Validation Strategies, J. Pharmaceutical Sci. 104: 3299-3313 (2015), las enseñanzas completas de la cual se incorporan en la presente. El color de los estándares BY también pueden ser expresados como el espacio de color CIE L*, a*, b* (espacio de color “CIELAB” o “CIELab”). *Véase* **Tabla 2**.

Tabla 2. Caracterización de los Estándares Europeos de Color Marrón-Amarillo en el Espacio de Color de CIE L*, a*, b*

Estd.	L*^	a*^	b*^	L*~	a*~	b*~
BY1	93.95	-2.76	28.55	92.84	-3.16	31.15
BY2	94.76	-2.96	22.69	94.25	-3.77	26.28
BY3	96.47	-2.84	16.41	95.92	-3.44	18.52
BY4	97.17	-1.94	9.07	97.67	-2.63	10.70
BY5	98.91	-1.19	4.73	98.75	-1.61	5.77
BY6	99.47	-0.59	2.09	99.47	-0.71	2.38
BY7	99.37	-0.31	1.13	99.71	-0.37	1.17

^ Reportado por Pack *et al.*

~ Medido experimentalmente aquí - los valores L* y b*, para cada estándar de color BY

Para permitir una selección de alto rendimiento para el ensayo de color, el método de ensayo espectrofotométrico (CIELAB) es una medición más adecuada y cuantitativa que los estándares de color de BY. El ensayo subrogado, además, se optimizó como se describe en la sección de Ejemplos. Para cualquiera de las muestras evaluadas por color, la concentración de proteína de las muestras de prueba debe ser estandarizada para concentración de proteína en las muestras, por ejemplo, 5 g/L, 10 g/L y similares por comparación.

III. Composiciones Anti-VEGF

Existen al menos cinco miembros de la familia del VEGF de proteínas que regulan la trayectoria de señalización: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, y factor de crecimiento placental (PlGF). Las composiciones anti-VEGF pueden comprender un antagonista del VEGF, el cual interactúa específicamente con uno o más miembros de la familia del VEGF de proteínas e inhibe una o más de sus actividades biológicas, por ejemplo, su actividad mitogénica, angiogénica y/o permeabilidad vascular.

En una modalidad, un método para producir una proteína anti-VEGF comprende: (a) proporcionar

una célula hospedera diseñada por ingeniería genética para expresar la proteína anti-VEGF; (b) cultivar la célula hospedera en un CDM bajo condiciones adecuadas en las cuales la célula expresa la proteína anti-VEGF; y (c) recolectar una preparación de la proteína anti-VEGF producida por la célula. En un aspecto, la proteína anti-VEGF se selecciona a partir del grupo que consiste en aflibercept, MiniTrampa recombinante (ejemplos de los cuales se describen en la Patente Estadounidense No. 7,279,159), un scFv y otras proteínas anti-VEGF. En un aspecto preferido, la proteína recombinante de interés es aflibercept.

Los inventores descubrieron que la manufacturación de proteínas anti-VEGF (*por ejemplo,* aflibercept) en ciertos CDMs producen una muestra biológica que presenta un color distintivo. Las propiedades de color distintivas se observaron en diferentes etapas de manufacturación y aún en la formulación final que comprende la proteína anti-VEGF. Como se observa en el Ejemplo 9, para la producción de MiniTrampa del VEGF, cultivar células en un CDM produce proteínas anti-VEGF (*por ejemplo,* aflibercept) con un color amarillo-marrón intenso. La etapa de afinidad de captura después de la recolección también produce una elución que presenta un cierto color - un color amarillo-marrón. Etapas de producción adicionales usando AEX también presentan un color amarillo-marrón sin embargo con intensidad reducida.

Como se describe en más detalle abajo, el color puede ser evaluado usando (i) el Estándar Europeo de Color BY en el cual se hace una inspección visual cualitativa o (ii) un ensayo colorimétrico, CIELAB, el cual es más cuantitativo que el sistema BY. Sin embargo, en cualquier caso, la evaluación de color entre múltiples muestras se normalizó contra la concentración de proteína con el fin de asegurar una evaluación/comparación significante. Por ejemplo, con referencia al Ejemplo 9, en particular la **Tabla 9-2**, lo eluido de la proteína A tiene un valor b* de alrededor de 2.52 el cual corresponde a aproximadamente un valor BY de BY5 (cuando se mide a una concentración de 5 g/L de proteína en lo eluido de la proteína A). Si el color de lo eluido de la proteína A está siendo comparado con otra muestra, entonces la comparación debe hacerse usando la misma concentración de proteína. De este modo, comparando lo eluido de la proteína A, a combinación de AEX la cual tiene un valor b* de alrededor de 0.74 (cuando se mide a una concentración de 5 g/L de proteína en lo eluido de la proteína A), el método de producción muestra una reducción sustancial en el color amarillo-marrón de la muestra a partir de lo eluido de la proteína A, a la combinación de AEX después de la cromatografía de AEX.

Las composiciones de la presente invención pueden ser caracterizadas por un color amarillo-marrón como se discute en la presente, por ejemplo, no más oscuro/más intenso que el Estándar Europeo de Color Amarillo-Marrón BY2-BY3, BY3-BY4, BY4-BY5 o BY5-BY6 y/o que tiene un valor b* 17-23, 10-17, 5-10, 3-5, o 1-3, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L de la proteína

anti-VEGF o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF y en donde la composición se obtiene como una muestra a partir de un elución de proteína A o recolectado clarificado de la recolección clarificada.

En una modalidad, las composiciones de la invención producidas usando CDM producen una muestra biológica que tiene un color amarillo marrón distinto, en donde la muestra puede ser caracterizada por una caracterización de color estándar reconocida:

(i) no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY2;

(ii) no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY3;

(iii) no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY4;

(iv) no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY5;

(v) entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY3;

(vi) entre el Estándar Europeo de Color BY3 y BY4;

(vii) entre el Estándar Europeo de Color BY4 y BY5, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF y en donde la composición se obtiene como una muestra a partir de una elución de proteína A de una recolección clarificada.

En otra modalidad, las composiciones de la invención producidas usando un CDM produce una muestra biológica que tiene un color amarillo-marrón distinto, en donde la composición se caracteriza por una caracterización de color estándar reconocida en la escala CIELAB:

(i) no más amarillo-marrón que un valor b* de aproximadamente 22-23;

(ii) no más amarillo-marrón que un valor b* de aproximadamente 16-17;

(iii) no más amarillo-marrón que un valor b* de 9-10;

(iv) no más amarillo-marrón que un valor b* de 4-5;

(v) no más amarillo-marrón que un valor b* de 2-3;

(vi) entre el valor b* de 17-23;

(vii) entre el valor b* de 10-17;

(viii) entre el valor b* de 5-10;

(ix) entre el valor b* de 3-5; o

(x) entre el valor b* de 1-3, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF y en donde la composición se obtiene como una muestra a partir de una elución de proteína A de una recolección clarificada.

En una modalidad, las composiciones de la invención producidas usando CDM pueden comprender otras especies o variantes de la proteína anti-VEGF. Estas variantes incluyen isoformas de la proteína anti-VEGF que comprenden uno o más residuos de aminoácidos oxidados colectivamente

referidos como variantes de oxo. La digestión enzimática de tales composiciones que comprenden la proteína anti-VEGF y sus variantes oxo puede comprender una o más de:

EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18) el cual comprende aproximadamente 0.004-0.013% de 2-oxo-histidinas,

QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19) el cual comprende aproximadamente 0.006-0.028% de 2-oxo-histidinas,

TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20) el cual comprende aproximadamente 0.049-0.085% de 2-oxo-histidinas,

DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17) el cual comprende aproximadamente 0.057-0.092% de 2-oxo-histidinas,

TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21) el cual comprende aproximadamente 0.008-0.022% de 2-oxo-histidinas, y/o

IIWDSR (SEQ ID NO.: 56) el cual comprende aproximadamente 0.185-0.298% triptofano dioxidado; o

EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18) el cual comprende aproximadamente 0.008% de 2-oxo-histidinas,

QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19) el cual comprende aproximadamente 0.02% de 2-oxo-histidinas,

TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20) el cual comprende aproximadamente 0.06% de 2-oxo-histidinas,

DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17) el cual comprende aproximadamente 0.07% de 2-oxo-histidinas,

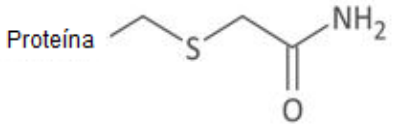
TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21) el cual comprende aproximadamente 0.01% de 2-oxo-histidinas, y/o

IIWDSR (SEQ ID NO.: 56) el cual comprende aproximadamente 0.23% di-oxo-triptofanos, en donde H* es una histidina que puede ser oxidada a 2-oxo-histidina y en donde C* es una cisteína la cual puede ser carboximetilada. En una modalidad particular, la proteína anti-VEGF es aflibercept. En otra modalidad, la proteína anti-VEGF es una MiniTrampa del VEGF.

En una modalidad ejemplar de la invención, las composiciones de la invención pueden comprender una proteína anti-VEGF, en donde no más de aproximadamente 1%, no más de aproximadamente 0.1% o aproximadamente 0.1-1%, 0.2-1%, 0.3-1%, 0.4-1%, 0.5-1%, 0.6-1%, 0.7-1%, 0.8-1% o 0.9-1% de residuos de histidina de la proteína anti-VEGF son 2-oxo-histidina. En tales composiciones, puede ser una población heterogénea de las variantes de proteína anti-VEGF cada una que tiene una cantidad variante de residuos de 2-oxo-histidina y residuos de histidina no oxidados. De este modo, el porcentaje de proteína anti-VEGF de 2-oxo-histidina en una composición se refiere a las 2-

oxo-histidinas específicas del sitio entre las moléculas anti-VEGF dividida por las histidinas totales específicas del sitio en las moléculas de la proteína anti-VEGF (oxidada más no oxidada) 100 veces. Un método para cuantificar el nivel de 2-oxo-histidinas en una composición es digerir el polipéptido con una proteasa (*por ejemplo,* Lys-C y/o tripsina) y analizar la cantidad de 2-oxo-histidinas en los péptidos resultantes mediante, por ejemplo, espectrometría de masas (MS).

Antes de la digestión de la proteína anti-VEGF, los grupos sulfhidrilo de cisteína son bloqueados por reacción con yodoacetamida (IAM) resultando en un residuo representado por la siguiente estructura química:



. Tal modificación protege los tioles libres de realizar puentes disulfuro y prevenir la alteración del enlace de disulfuro. La presente invención incluye composiciones (*por ejemplo,* composiciones acuosas) que comprenden proteína anti-VEGF y sus variantes las cuales, cuando se modifican con IAM y se digieren con proteasa (*por ejemplo,* Lys-C y tripsina) y se analizan por espectrometría de masas comprenden los siguientes péptidos:

EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18) el cual comprende aproximadamente 0.004-0.013% de 2-oxo-histidinas,

QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19) el cual comprende aproximadamente 0.006-0.028% de 2-oxo-histidinas,

TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20) el cual comprende aproximadamente 0.049-0.085% de 2-oxo-histidinas,

DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17) el cual comprende aproximadamente 0.057-0.092% de 2-oxo-histidinas,

TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21) el cual comprende aproximadamente 0.008-0.022% de 2-oxo-histidinas, y/o

IIWDSR (SEQ ID NO.: 56) el cual comprende aproximadamente 0.185-0.298% triptofano dioxidado; o

EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18) el cual comprende aproximadamente 0.008% de 2-oxo-histidinas,

QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19) el cual comprende aproximadamente 0.02% de 2-oxo-histidinas,

TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20) el cual comprende aproximadamente 0.06% de 2-oxo-histidinas,

DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17) el cual comprende aproximadamente 0.07% de 2-oxo-

histidinas,

TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21) el cual comprende aproximadamente 0.01% de 2-oxo-histidinas, y/o

IIWDSR (SEQ ID NO.: 56) el cual comprende aproximadamente 0.23% di-oxo-triptofanos,

en donde H* es 2-oxo-histidina y en donde C* es cisteína carboximetilada. En una modalidad de la invención, los péptidos son desglicosilados con PNGasa F.

La presente invención incluye composiciones que comprenden proteína anti-VEGF, en donde aproximadamente 0.1%-10% de todas las histidinas de la proteína anti-VEGF son modificadas a 2-oxo-histidina. Además, el color de la composición es no más oscuro/más intenso que, por ejemplo, el Estándar Europeo de Color Marrón-Amarillo BY2-BY3, BY3-BY4, BY4-BY5 o BY5-BY6, o, alternativamente, que tiene un valor b*, como se caracteriza usando CIE L*, a*, b* de aproximadamente 17-23, 10-17, 5-10, 3-5, o 1-3, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF. La composición se obtiene ya sea como una muestra a partir de una recolección clarificada o una elución de proteína A de la recolección clarificada. Tales composiciones se pueden obtener a partir de la recolección clarificada cuando el material recolectado se somete a un procedimiento de cromatografía de captura. En un aspecto, la etapa de captura es un procedimiento de cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, una columna de afinidad de proteína A. Cuando una muestra de afinidad se analiza usando cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS), uno o más variantes pueden ser detectadas.

La presente invención incluye composiciones que comprenden proteína anti-VEGF, en donde aproximadamente 0.1%-10% de todos los triptofanos de la proteína anti-VEGF son modificados a cinurenina. Además, el color de la composición es no más oscuro/más intenso que el Estándar Europeo de Color Marrón-Amarillo BY2-BY3, BY3-BY4, BY4-BY5 o BY5-BY6 y/o que tiene un valor b*, como se caracteriza por CIE L*, a*, b* de aproximadamente 17-23, 10-17, 5-10, 3-5, o 1-3, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L de la proteína anti-VEGF o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF. La composición se obtiene como una muestra a partir de una recolección clarificada o una elución de proteína A de la recolección clarificada. Tales composiciones se pueden obtener a partir de la recolección clarificada cuando se someten a un procedimiento de cromatografía de captura. La etapa de captura es un procedimiento de cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, una columna de afinidad de proteína A. Cuando una muestra de afinidad se analiza usando cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS), una o más de estas variantes pueden ser detectadas.

La presente invención incluye composiciones que comprenden proteína anti-VEGF, en donde aproximadamente 0.1%-10% de todos los triptofanos de la proteína anti-VEGF son modificados a

mono-hidroxil triptofano. Además, el color de la composición es no más oscuro/más intenso que el Estándar Europeo de Color Marrón-Amarillo BY2-BY3, BY3-BY4, BY4-BY5 o BY5-BY6 y/o que tiene un valor b* caracterizado por CIE L*, a*, b* de aproximadamente 17-23, 10-17, 5-10, 3-5, o 1-3, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L de la proteína anti-VEGF o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF. La composición se obtiene como una muestra a partir de una recolección clarificada o una elución de proteína A de la recolección clarificada. Tales composiciones se pueden obtener a partir de la recolección clarificada cuando se someten a un procedimiento de cromatografía de captura. La etapa de captura es un procedimiento de cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, una columna de afinidad de proteína A. Cuando una muestra extraída a partir de la etapa de afinidad se analiza usando cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS), una o más de estas variantes pueden ser detectadas.

La presente invención incluye composiciones que comprenden proteína anti-VEGF, en donde aproximadamente 0.1%-10% de todos los triptofanos de la proteína anti-VEGF son modificados a di-hidroxil triptofano. Además, el color es no más oscuro/más intenso que el Estándar Europeo de Color Marrón-Amarillo BY2-BY3, BY3-BY4, BY4-BY5 o BY5-BY6 y/o que tiene un valor b* caracterizado usando CIE L*, a*, b* de aproximadamente 17-23, 10-17, 5-10, 3-5, o 1-3, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L de la proteína anti-VEGF o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF. La composición se obtiene como una muestra a partir de una recolección clarificada o una elución de proteína A de la recolección clarificada. Tales composiciones se pueden obtener a partir de la recolección clarificada hecha usando CDM que comprende la proteína anti-VEGF, así como también sus variantes oxo sometidas a un procedimiento de cromatografía de captura. La etapa de captura es un procedimiento de cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, una columna de afinidad de proteína A. Cuando una muestra extraída a partir de la etapa de afinidad se analiza usando cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS), una o más de estas variantes pueden ser detectadas.

La presente invención incluye composiciones que comprenden proteína anti-VEGF, en donde aproximadamente 0.1%-10% de todos los triptofanos de la proteína anti-VEGF son modificadas a tri-hidroxil triptofano. Además, el color de la composición es no más oscuro/más intenso que el Estándar Europeo de Color Marrón-Amarillo BY2-BY3, BY3-BY4, BY4-BY5 o BY5-BY6 y/o que tiene un valor b* caracterizado por CIE L*, a*, b* de aproximadamente 17-23, 10-17, 5-10, 3-5, o 1-3, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L de la proteína anti-VEGF o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF. La composición se obtiene como una muestra a partir de una recolección clarificada o una elución de proteína A de la recolección clarificada. Tales composiciones se pueden obtener usando cromatografía de captura. La etapa de captura es un

procedimiento de cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, una columna de afinidad de proteína A. Cuando una muestra extraída a partir de la afinidad se analiza usando cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS), una o más de estas variantes pueden ser detectadas.

En una modalidad, las composiciones de la invención pueden comprender una proteína anti-VEGF, en donde la proteína anti-VEGF puede comprender modificaciones de uno o más residuos como sigue: una o más asparaginas son desamidados; uno o más ácido aspárticos son convertidos a iso-aspartato y/o asparagina; una o más metioninas son oxidadas; uno o más triptofanos son convertidos a N-formilcinurenina; uno o más triptofanos son mono-hidroxil triptofano; uno o más triptofanos son di-hidroxil triptofano; uno o más triptofanos son tri-hidroxil triptofano; una o más argininas son convertidas a Arg 3-desoxiglucosona; la glicina C-terminal no está presente; y/o existen uno o más glicositos no glicosilados.

Tales composiciones se pueden obtener a partir de una recolección clarificada hecha usando CDM que comprende la proteína anti-VEGF, así como también sus variantes sometidas a, por ejemplo, un procedimiento de cromatografía de captura. La etapa de captura es un procedimiento de cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, una columna de Proteína A. Cuando una muestra extraída a partir de la etapa de afinidad se analiza usando, por ejemplo, cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS), una o más de estas variantes pueden ser detectadas.

En una modalidad ejemplar, las composiciones de la invención pueden comprender una proteína anti-VEGF que comparte características estructurales de aflibercept el cual puede ser oxidado en uno o más de los siguientes: His86, His110, His145, His209, His95, His19 y/o His203 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); Trp58 y/o Trp138 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); Tyr64 (o posiciones equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); Phe44 y/o Phe166 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); y/o Met10, Met 20, Met163 y/o Met192 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept). Tales composiciones se pueden obtener a partir de una recolección clarificada hecha usando CDM que comprende aflibercept, así como también sus variantes oxo sometidas a un procedimiento de cromatografía de captura. La etapa de captura puede ser un procedimiento de cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, una columna de Proteína A. Cuando una muestra extraída a partir de la etapa de afinidad se analiza usando, por ejemplo, cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS), una o más de estas variantes pueden ser detectadas.

En una modalidad, las composiciones de la invención pueden comprender una MiniTrampa del

VEGF que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO.: 46, la cual puede ser oxidada en His86, His110, His145, His209, His95, His19 y/o His203; Trp58 y/o Trp138; Tyr64; Phe44 y/o Phe166; y/o Met10, Met 20, Met163 y/o Met192. Tales composiciones se pueden obtener a partir de la recolección clarificada hecha usando CDM que comprende la MiniTrampa del VEGF, así como también sus variantes oxo sometidas a un procedimiento de cromatografía de captura. La etapa de captura es un procedimiento de cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, una columna de Proteína A - cuando se analiza usando cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS), una o más de estas variantes pueden ser detectadas.

En algunas modalidades ejemplares, las composiciones de la presente invención pueden comprender una proteína anti-VEGF y sus variantes (que incluye variantes de oxo), en donde la cantidad de las variantes de proteína en la composición puede ser a lo sumo aproximadamente 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.9%, 1.8%, 1.7%, 1.6%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, o 0.0% y varía dentro de uno o más de los precedentes. Tales composiciones se pueden obtener a partir de la recolección clarificada hecha usando CDM que comprende la proteína anti-VEGF, así como también sus variantes sometidas a un procedimiento de cromatografía de captura. La etapa de captura es un procedimiento de cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, una columna de Proteína A - cuando se analiza usando cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS), una o más de estas variantes pueden ser detectadas. En un aspecto, el color de tal composición es no más oscuro/más intenso que, por ejemplo, el Estándar Europeo de Color Marrón-Amarillo BY2-BY3, BY3-BY4, BY4-BY5 o BY5-BY6 y/o que tiene un valor b* caracterizado por CIE L*, a*, b* de aproximadamente 17-23, 10-17, 5-10, 3-5, o 1-3, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF.

En otras modalidades ejemplares, las composiciones de la presente invención pueden comprender una proteína anti-VEGF y sus variantes, en donde la cantidad de las variantes de proteína en la composición puede ser de aproximadamente 0% hasta aproximadamente 20%, por ejemplo, aproximadamente 0% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.05% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.2% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.3% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.4% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.6% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.7% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.8% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.9% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 1% hasta

aproximadamente 20%, aproximadamente 1.5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 4% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 6% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 7% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 8% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 9% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 10% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.05% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.2% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.3% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.4% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.6% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.7% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.8% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.9% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 1% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 1.5% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 4% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 6% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 7% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 8% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 9% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.05% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.2% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.3% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.4% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.6% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.7% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.8% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.9% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 1% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 1.5% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 4% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 6% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 7% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.05% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.2% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.3% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.4% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente

0.6% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.7% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.8% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.9% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 1% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 1.5% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 4% hasta aproximadamente 5% y varía dentro de uno o más de los precedentes. Tales composiciones se pueden obtener realizando cromatografía de captura en una muestra recolectada. La etapa de captura es un procedimiento de cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, una columna de Proteína A. Cuando una muestra se analiza usando cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS), una o más de estas variantes pueden ser detectadas. En un aspecto, el color de tal composición es no más oscuro/más intenso que, por ejemplo, el Estándar Europeo de Color Marrón-Amarillo BY2-BY3, BY3-BY4, BY4-BY5 o BY5-BY6 y/o que tiene un valor b* caracterizado por CIE L*, a*, b* de aproximadamente 17-23, 10-17, 5-10, 3-5, o 1-3, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF.

En una modalidad, las composiciones de la presente invención pueden comprender una proteína anti-VEGF que incluye sus especies acídicas, en donde la cantidad de especies acídicas en la composición puede ser de aproximadamente 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.9%, 1.8%, 1.7%, 1.6%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, o 0.0% y varía dentro de uno o más de los precedentes. Como se discute *supra*, tales especies acídicas pueden ser detectadas por varios métodos tales como intercambio iónico, por ejemplo, WCX (WCX-10 HPLC, una cromatografía de intercambio catiónico débil), o IEF (enfoque isoeléctrico). Comúnmente, las especies acídicas eluyen antes que el pico principal durante CEX o después que el pico principal durante el análisis de AEX (*véase* **Figura 16** y **Figura 17**). Las composiciones que comprenden especies acídicas se pueden obtener a partir de material biológico tal como material producido por afinidad o recolección usando cromatografía de intercambio iónico.

En un aspecto, el color de tal composición es no más oscuro/más intenso que, por ejemplo, el Estándar Europeo de Color Marrón-Amarillo BY2-BY3, BY3-BY4, BY4-BY5 o BY5-BY6 y/o que tiene un valor b* caracterizado por CIE L*, a*, b* de aproximadamente 17-23, 10-17, 5-10, 3-5, o 1-3, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L o aproximadamente 10 g/L. Como un ejemplo, con referencia a la **Figura 16** y **Figura 17**, las fracciones F1 y F2 representan fracciones acídicas las cuales comprenden la mayoría de las especies acídicas. Los picos 1 y 2 de MT1 en la **Figura 17** comprenden las especies acídicas y las fracciones F1 y F2 comprenden la mayoría de las fracciones acídicas. Las fracciones que comprenden tales especies acídicas (F1 y F2) también

muestran un color amarillo-marrón comparado con otras fracciones (**Figura 18B** y **Figura 18C**).

En otra modalidad, las composiciones de la presente invención comprenden una proteína anti-VEGF que incluye sus especies acídicas, en donde la cantidad de especies acídicas en la composición puede ser de aproximadamente 0% hasta aproximadamente 20%, por ejemplo, aproximadamente 0% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.05% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.2% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.3% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.4% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.6% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.7% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.8% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.9% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 1% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 1.5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 4% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 6% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 7% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 8% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 9% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 10% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.05% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.2% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.3% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.4% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.6% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.7% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.8% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.9% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 1% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 1.5% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 4% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 6% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 7% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 8% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 9% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.05% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.2% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.3% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.4% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.6% hasta aproximadamente 7.5%,

aproximadamente 0.7% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.8% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.9% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 1% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 1.5% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 4% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 6% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 7% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.05% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.2% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.3% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.4% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.6% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.7% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.8% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.9% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 1% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 1.5% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 4% hasta aproximadamente 5% y varía dentro de uno o más de los precedentes. Como se discute anteriormente, tales especies acídicas pueden ser detectadas por varios métodos, tales como intercambio iónico, por ejemplo, WCX (WCX-10 HPLC, una cromatografía de intercambio catiónico débil), o IEF (enfoque isoeléctrico). Típicamente, especies acídicas eluyen antes que el pico principal durante CEX o después que el pico principal durante el análisis de AEX (*Véase* **Figura 16** y **Figura 17**).

Usando una columna de intercambio catiónico, todos los picos que eluyen previo al pico principal de interés se asumen como la región acídica, y todos los picos que eluyen después de la proteína de interés se asumen como la región básica. En modalidades ejemplares, las especies acídicas pueden ser eluidas como dos o más regiones acídicas y pueden ser numeradas AR1, AR2, AR3 y así sucesivamente con base en un cierto tiempo de retención de los picos y en la columna de intercambio iónico usada.

En una modalidad, las composiciones pueden comprender una proteína anti-VEGF que incluye especies acídicas, en donde AR1 es 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.9%, 1.8%, 1.7%, 1.6%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, o 0.0%, y varía dentro de uno o más de los precedentes. En un aspecto, las composiciones pueden comprender una proteína anti-VEGF que incluye sus especies acídicas, en donde AR1 es aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.0% hasta

aproximadamente 4%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 3%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 2%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 8%, aproximadamente 8% hasta aproximadamente 10%, o aproximadamente 10% hasta aproximadamente 15%, y varía dentro de uno o más de los precedentes. Como se discute anteriormente, tales regiones acídicas pueden ser detectadas por varios métodos, tales como intercambio iónico, por ejemplo, WCX (WCX-10 HPLC, una cromatografía de intercambio catiónico débil), o IEF (enfoque isoeléctrico). Comúnmente, especies acídicas eluyen antes que el pico principal durante CEX o después que el pico principal durante el análisis de AEX (*Véase* **Figura 16** y **Figura 17**).

En otra modalidad, las composiciones pueden comprender una proteína anti-VEGF que incluye especies acídicas, en donde AR2 es 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.9%, 1.8%, 1.7%, 1.6%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, o 0.0%, y varía dentro de uno o más de los precedentes. En un aspecto, las composiciones pueden comprender una proteína anti-VEGF que incluye especies acídicas, en donde AR2 es aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 4%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 3%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 2%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 8%, aproximadamente 8% hasta aproximadamente 10%, o aproximadamente 10% hasta aproximadamente 15%, y varía dentro de uno o más de los precedentes.

En una modalidad, las composiciones pueden comprender una proteína anti-VEGF que incluye especies básicas, en donde la cantidad de especies básicas en la composición puede ser a lo sumo aproximadamente 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.9%, 1.8%, 1.7%, 1.6%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, o 0.0% y varía dentro de uno o más de los precedentes. En un aspecto, las composiciones pueden comprender una proteína anti-VEGF y sus especies básicas, en donde la cantidad de especies básicas en la composición comparada con la proteína anti-VEGF puede ser 0% hasta aproximadamente 20% *por ejemplo,* aproximadamente 0% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.05% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.2% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.3% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.4% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.6% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.7% hasta

aproximadamente 20%, aproximadamente 0.8% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0.9% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 1% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 1.5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 4% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 6% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 7% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 8% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 9% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 10% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 0% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.05% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.2% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.3% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.4% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.6% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.7% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.8% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.9% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 1% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 1.5% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 4% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 6% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 7% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 8% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 9% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.05% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.2% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.3% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.4% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.6% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.7% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.8% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0.9% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 1% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 1.5% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 4% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 6% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 7% hasta aproximadamente 7.5%, aproximadamente 0% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.05% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.2% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente

0.3% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.4% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.6% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.7% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.8% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.9% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 1% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 1.5% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 4% hasta aproximadamente 5% y varía dentro de uno o más de los precedentes.

Las especies básicas pueden ser eluidas como dos o más regiones básicas y pueden ser numeradas BR1, BR2, BR3 y así sucesivamente con base en cierto tiempo de retención de los picos e intercambio iónico usado.

En una modalidad, las composiciones pueden comprender una proteína anti-VEGF que incluye sus especies básicas, en donde BR1 es 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.9%, 1.8%, 1.7%, 1.6%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, o 0.0%, y varía dentro de uno o más de los precedentes. En un aspecto, las composiciones pueden comprender una proteína anti-VEGF y sus especies básicas, en donde BR1 es aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 4%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 3%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 2%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 8%, aproximadamente 8% hasta aproximadamente 10%, o aproximadamente 10% hasta aproximadamente 15%, y varía dentro de uno o más de los precedentes.

En otra modalidad, la composición puede comprender una proteína anti-VEGF y sus especies básicas, en donde BR2 es 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.9%, 1.8%, 1.7%, 1.6%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, o 0.0%, y varía dentro de uno o más de los precedentes. En un aspecto, las composiciones pueden comprender una proteína anti-VEGF y sus especies básicas de la proteína anti-VEGF, en donde BR2 es aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 4%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 3%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 2%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 8%, aproximadamente 8% hasta aproximadamente 10%, o aproximadamente 10% hasta aproximadamente 15%, y varía dentro de uno o más de los

precedentes.

En otra modalidad, la composición puede comprender una proteína anti-VEGF y sus especies básicas, en donde BR3 es 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.9%, 1.8%, 1.7%, 1.6%, 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, o 0.0%, y varía dentro de uno o más de los precedentes. En un aspecto, las composiciones pueden comprender una proteína anti-VEGF y sus especies básicas de la proteína anti-VEGF, en donde BR3 es aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 4%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 3%, aproximadamente 0.0% hasta aproximadamente 2%, aproximadamente 3% hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 5% hasta aproximadamente 8%, aproximadamente 8% hasta aproximadamente 10%, o aproximadamente 10% hasta aproximadamente 15%, y varía dentro de uno o más de los precedentes.

Oxidación de aflibercept foto-inducida

Además de descubrir las diferentes características de color o variantes de las composiciones de la proteína anti-VEGF producidas usando CDM, los inventores también descubrieron que tales composiciones pueden ser producidas artificialmente en el laboratorio por exposición a la luz.

Variantes modificadas, que incluyen oxidadas, de una composición anti-VEGF se pueden producir exponiendo una proteína anti-VEGF a luz fría-blanca o luz ultravioleta. En un aspecto, la composición anti-VEGF puede comprender aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 50-veces de incremento en uno o más oligopéptidos modificados, comparado con la muestra, en donde los oligopéptidos son seleccionados a partir del grupo que consiste en:

DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17), EIGLLTC*EATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18), QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19), TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20), TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21), SDTGRPFVEMYSEIPEIIH*MTEGR (SEQ ID NO.: 22), VH*EKDK (SEQ ID NO.: 23), SDTGRPFVEM*YSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 64), SDTGRPFVEMYSEIPEIIHM*TEGR (SEQ ID NO.: 65), TQSGSEM*K (SEQ ID NO.: 66), SDQGLYTC*AASSGLM*TK (SEQ ID NO.: 67), IIW*DSR (SEQ ID NO.: 28), RIIW*DSR (SEQ ID NO.: 115), IIW*DSRK (SEQ ID NO.: 114), TELNVGIDFNW*EYPSSK (SEQ ID NO.: 29), GFIISNATY*K (SEQ ID NO.: 69), KF*PLDTLIPDGK (SEQ ID NO.: 70) F*LSTLTIDGVTR (SEQ ID NO.: 32), en donde H* es una histidina que es oxidada a 2-oxo-histidina, en donde C* es una cisteína que es carboximetilada, en donde M* es una metionina oxidada, en donde W* es un triptofano oxidado, en donde Y* es una tirosina oxidada, y en donde F* es una fenilalanina oxidada. En un aspecto adicional, la composición anti-VEGF puede comprender aproximadamente 1.5 hasta

aproximadamente 10-veces de incremento en uno o más oligopéptidos modificados exponiendo una composición anti-VEGF a luz fría-blanca por un periodo de tiempo, por ejemplo, aproximadamente 30 horas. En otro aspecto, la composición anti-VEGF puede comprender aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 10-veces de incremento en uno o más oligopéptidos modificados exponiendo una muestra a luz fría-blanca por aproximadamente 75 horas. En aún otro aspecto, la composición anti-VEGF puede comprender aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 20-veces de incremento en uno o más oligopéptidos exponiendo la muestra a luz fría-blanca por aproximadamente 100 horas. En aún otro aspecto, la composición anti-VEGF puede comprender aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 20-veces de incremento en uno o más oligopéptidos exponiendo la muestra a luz fría-blanca por aproximadamente 150 horas. En todavía otro aspecto, la composición anti-VEGF puede comprender aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 50-veces de incremento en uno o más oligopéptidos exponiendo la muestra a luz fría-blanca por aproximadamente 300 horas – *véase* Ejemplo 4 abajo.

La composición anti-VEGF puede comprender aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 3-veces de incremento en uno o más oligopéptidos, como se describe anteriormente, exponiendo una muestra de una composición anti-VEGF a luz ultravioleta por aproximadamente 4 horas. En otro aspecto, la composición anti-VEGF puede comprender aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 10 -veces de incremento en uno o más oligopéptidos exponiendo la muestra a luz ultravioleta por aproximadamente 10 horas. En aún otro aspecto, la composición anti-VEGF puede comprender aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 10-veces de incremento en uno o más oligopéptidos exponiendo la muestra a luz ultravioleta por aproximadamente 16 horas. En aún otro aspecto, la composición anti-VEGF puede comprender aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 25-veces de incremento en uno o más oligopéptidos exponiendo la muestra a luz ultravioleta por aproximadamente 20 horas. En aún otro aspecto, la composición anti-VEGF puede comprender aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 25-veces de incremento en uno o más oligopéptidos exponiendo la matriz de muestra a luz ultravioleta por aproximadamente 40 horas. *Véase* Ejemplo 4.

Glicodiversidad – proteína anti-VEGF producida usando CDM

Las composiciones de esta invención comprenden una proteína anti-VEGF, en donde la proteína anti-VEGF producida en CDM tiene una variedad de glicodiversidad. Los diferentes perfiles de glicosilación de la proteína anti-VEGF están dentro del alcance de esta invención.

En algunas modalidades ejemplares de la invención, la composición puede comprender una proteína anti-VEGF glicosilada en una o más asparaginas como sigue: glicosilación G0-GlcNAc; glicosilación G1-GlcNAc; glicosilación G1S-GlcNAc; glicosilación G0; glicosilación G1; glicosilación G1S;

glicosilación G2; glicosilación G2S; glicosilación G2S2; glicosilación G0F; glicosilación G2F2S; glicosilación G2F2S2; glicosilación G1F; glicosilación G1FS; glicosilación G2F; glicosilación G2FS; glicosilación G2FS2; glicosilación G3FS; glicosilación G3FS3; glicosilación G0-2GlcNAc; glicosilación Man4; glicosilación Man4_A1G1; glicosilación Man4_A1G1S1; glicosilación Man5; glicosilación Man5_A1G1; glicosilación Man5_A1G1S1; glicosilación Man6; glicosilación Man6_G0+Fosfato; glicosilación Man6+Fosfato; y/o glicosilación Man7. En un aspecto, la proteína de interés puede ser aflibercept, anticuerpo anti-VEGF o MiniTrampa del VEGF.

En una modalidad, la composición puede tener un perfil de glicosilación como sigue: aproximadamente 40 % hasta aproximadamente 50% de glicanos fucosilados totales, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 50% de glicanos sialilados totales, aproximadamente 6% hasta aproximadamente 15% de manosa-5, y aproximadamente 60% hasta aproximadamente 79% de glicanos galactosilados. (Ejemplo 6).

En una modalidad, la composición puede comprender una proteína anti-VEGF, en donde la proteína de interés tiene glicosilación de Man5 a aproximadamente 32.4% de 123 residuos de asparagina y/o aproximadamente 27.1% de 196 residuos de asparagina. En un aspecto, la proteína de interés puede ser aflibercept, anticuerpo anti-VEGF o MiniTrampa del VEGF.

En otra modalidad, la composición puede tener aproximadamente 40 %, aproximadamente 41%, aproximadamente 42%, aproximadamente 43%, aproximadamente 44%, aproximadamente 45%, aproximadamente 46%, aproximadamente 47%, aproximadamente 48%, aproximadamente 49% o aproximadamente 50% de glicanos fucosilados totales.

En aún otra modalidad, la composición puede tener aproximadamente 30 %, aproximadamente 31%, aproximadamente 32%, aproximadamente 33%, aproximadamente 34%, aproximadamente 35%, aproximadamente 36%, aproximadamente 37%, aproximadamente 38%, aproximadamente 39%, aproximadamente 40%, aproximadamente 41%, aproximadamente 42%, aproximadamente 43%, aproximadamente 44%, aproximadamente 45%, aproximadamente 46%, aproximadamente 47%, aproximadamente 48%, aproximadamente 49% o aproximadamente 50% de glicanos sialilados totales.

En una modalidad, la composición puede tener aproximadamente 6 %, aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 11%, aproximadamente 12%, aproximadamente 13%, aproximadamente 14%, o aproximadamente 15% de manosa-5.

En otra modalidad, la composición puede tener aproximadamente 60 %, aproximadamente 61%, aproximadamente 62%, aproximadamente 63%, aproximadamente 64%, aproximadamente 65%, aproximadamente 66%, aproximadamente 67%, aproximadamente 68%, aproximadamente 69%,

aproximadamente 70%, aproximadamente 71%, aproximadamente 72%, aproximadamente 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, o aproximadamente 79% de glicanos galactosilados totales.

En una modalidad, la proteína anti-VEGF puede tener un nivel reducido de glicanos fucosilados por aproximadamente 1%, 1.2%, 1.5%, 2%, 2.2%, 2.5%, 3%, 3.2%, 3.5%, 4%, 4.2%, 4.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%. La proteína anti-VEGF puede tener un nivel reducido de glicanos fucosilados que varía dentro de uno o más de los valores precedentes, por ejemplo, 1-10%, 1-15%, 1-20%, 1-25%, 1-30%, 1-35%, 1-40%, 1-41%, 1-42%, 1-43%, 1-44%, 1-45%, 1-46%, 1-47%, 1-48%, 1-49%, 1-50%, 2-10%, 2-15%, 2-20%, 2-25%, 2-30%, 2-35%, 2-40%, 2-41%, 2-42%, 2-43%, 2-44%, 2-45%, 2-46%, 2-47%, 2-48%, 2-49%, 2-50%, 3-10%, 3-15%, 3-20%, 3-25%, 3-30%, 3-35%, 3-40%, 3-41%, 3-42%, 3-43%, 3-44%, 3-45%, 3-46%, 3-47%, 3-48%, 3-49%, 3-50%, 4-10%, 4-15%, 4-20%, 4-25%, 4-30%, 4-35%, 4-40%, 4-41%, 4-42%, 4-43%, 4-44%, 4-45%, 4-46%, 4-47%, 4-48%, 4-49%, 4-50% o 1-99% comparado con el nivel de glicanos fucosilados en una proteína anti-VEGF producida usando un hidrolizado de soya.

En una modalidad, la proteína anti-VEGF puede tener un nivel reducido de glicanos sialilados por aproximadamente 1%, 1.2%, 1.5%, 2%, 2.2%, 2.5%, 3%, 3.2%, 3.5%, 4%, 4.2%, 4.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%. La proteína anti-VEGF puede tener un nivel reducido de glicanos sialilados que varía dentro de uno o más de los valores precedentes, por ejemplo, 1-10%, 1-15%, 1-20%, 1-25%, 1-30%, 1-35%, 1-40%, 1-41%, 1-42%, 1-43%, 1-44%, 1-45%, 1-46%, 1-47%, 1-48%, 1-49%, 1-50%, 2-10%, 2-15%, 2-20%, 2-25%, 2-30%, 2-35%, 2-40%, 2-41%, 2-42%, 2-43%, 2-44%, 2-45%, 2-46%, 2-47%, 2-48%, 2-49%, 2-50%, 3-10%, 3-15%, 3-20%, 3-25%, 3-30%, 3-35%, 3-40%, 3-41%, 3-42%, 3-43%, 3-44%, 3-45%, 3-46%, 3-47%, 3-48%, 3-49%, 3-50%, 4-10%, 4-15%, 4-20%, 4-25%, 4-30%, 4-35%, 4-40%, 4-41%, 4-42%, 4-43%, 4-44%, 4-45%, 4-46%, 4-47%, 4-48%, 4-49%, 4-50% o 1-99% comparado con el nivel de glicanos sialilados en una proteína anti-VEGF producida usando un hidrolizado de soya.

En otra modalidad, la proteína anti-VEGF puede tener un nivel reducido de glicanos galactosilados por aproximadamente 1%, 1.2%, 1.5%, 2%, 2.2%, 2.5%, 3%, 3.2%, 3.5%, 4%, 4.2%, 4.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%. La proteína anti-VEGF puede tener un nivel reducido de glicanos galactosilados que varía dentro de uno o más de los valores precedentes, *por ejemplo,* 1-10%, 1-15%, 1-20%, 1-25%, 1-30%, 1-35%, 1-40%, 1-41%, 1-42%, 1-43%, 1-44%, 1-45%, 1-46%, 1-47%, 1-48%, 1-49%, 1-50%, 2-10%, 2-15%, 2-20%, 2-25%, 2-30%, 2-35%, 2-40%, 2-41%, 2-42%, 2-43%, 2-44%, 2-45%, 2-46%,

2-47%, 2-48%, 2-49%, 2-50%, 3-10%, 3-15%, 3-20%, 3-25%, 3-30%, 3-35%, 3-40%, 3-41%, 3-42%, 3-43%, 3-44%, 3-45%, 3-46%, 3-47%, 3-48%, 3-49%, 3-50%, 4-10%, 4-15%, 4-20%, 4-25%, 4-30%, 4-35%, 4-40%, 4-41%, 4-42%, 4-43%, 4-44%, 4-45%, 4-46%, 4-47%, 4-48%, 4-49%, 4-50% o 1-99% comparado con el nivel de glicanos galactosilados en una proteína anti-VEGF producida usando un hidrolizado de soya.

En una modalidad, la proteína anti-VEGF puede tener un nivel incrementado de glicanos manosilados por aproximadamente 1%, 1.2%, 1.5%, 2%, 2.2%, 2.5%, 3%, 3.2%, 3.5%, 4%, 4.2%, 4.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%. La proteína anti-VEGF puede tener un nivel incrementado de glicanos manosilados que varía dentro de uno o más de los valores precedentes, *por ejemplo,* 1-10%, 1-15%, 1-20%, 1-25%, 1-30%, 1-35%, 1-40%, 1-41%, 1-42%, 1-43%, 1-44%, 1-45%, 1-46%, 1-47%, 1-48%, 1-49%, 1-50%, 2-10%, 2-15%, 2-20%, 2-25%, 2-30%, 2-35%, 2-40%, 2-41%, 2-42%, 2-43%, 2-44%, 2-45%, 2-46%, 2-47%, 2-48%, 2-49%, 2-50%, 3-10%, 3-15%, 3-20%, 3-25%, 3-30%, 3-35%, 3-40%, 3-41%, 3-42%, 3-43%, 3-44%, 3-45%, 3-46%, 3-47%, 3-48%, 3-49%, 3-50%, 4-10%, 4-15%, 4-20%, 4-25%, 4-30%, 4-35%, 4-40%, 4-41%, 4-42%, 4-43%, 4-44%, 4-45%, 4-46%, 4-47%, 4-48%, 4-49%, 4-50% o 1-99% comparado con el nivel de glicanos manosilados en una proteína anti-VEGF producida usando un hidrolizado de soya.

Las composiciones descritas en esta sección se pueden producir por varios parámetros en dirección ascendente y dirección descendente como se describe abajo en las secciones IV y V, respectivamente.

IV. Preparación de las Composiciones Usando Tecnologías de Proceso en Dirección Ascendente

Para productos biológicos, la implementación de un proceso en dirección ascendente flexible y robusta es deseable. Un proceso en dirección ascendente eficiente puede conducir a producción deseable y escalada de una proteína de interés. Los inventores descubrieron que las composiciones de la invención que comprenden una proteína anti-VEGF se pueden producir modulando condiciones durante la producción de proteína en dirección ascendente, tales como cambios en componentes del medio de un CDM. Cada etapa en un proceso en dirección ascendente puede afectar la calidad, pureza y cantidad de la proteína manufacturada.

La presente descripción proporciona evidencia para la existencia de ciertas variantes de aflibercept y/o MiniTrampa producidas usando CDM. Estas variantes incluyen isoformas que comprenden uno o más residuos de aminoácido oxidados. Ejemplos de residuos oxidados incluyen, pero no se limitan a, uno o más residuos de histidina, triptofano, metionina, fenilalanina o tirosina. Las composiciones producidas usando el CDM modificado pueden producir una preparación de proteína anti-VEGF con

un valor objetivo deseado de variantes de proteína de aflibercept y/o MiniTrampa. Como se alude anteriormente, también puede haber un color amarillo-marrón asociado con las fracciones producidas usando un CDM. (Como se mencionó anteriormente, no todos los CDMs probados por los inventores manifestaron una decoloración distinta).

Esta invención incluye cultivar una célula hospedera en un CDM modificado bajo condiciones adecuadas en las cuales la célula expresa una proteína recombinante de interés seguido por recolección de una preparación de la proteína recombinante de interés producida por la célula. Tal CDM modificado puede ser usado para producir las composiciones como se describe anteriormente en la Sección III.

En una modalidad, el método comprende cultivar una célula hospedera en un CDM bajo condiciones adecuadas, en donde la célula hospedera expresa una proteína recombinante de interés, tal como aflibercept. El método comprende además, recolectar una preparación de la proteína recombinante de interés producida por la célula, en donde las condiciones adecuadas incluyen una CDM con una: concentración acumulativa de hierro en tal CDM que es menos de aproximadamente 55 µM, concentración acumulativa de cobre en tal CDM que es menos de o igual a aproximadamente 0.8 µM, concentración acumulativa de níquel en tal CDM que es menos de o igual a aproximadamente 0.40 µM, concentración acumulativa de zinc en tal CDM que es menos de o igual a aproximadamente 56 µM, concentración acumulativa de cisteína en tal CDM que es menos de aproximadamente 10 mM; y/o un antioxidante en tal CDM en una concentración de aproximadamente 0.001 mM hasta aproximadamente 10 mM para un antioxidante único y no más de aproximadamente 30 mM de concentración acumulativa si múltiples antioxidantes se agregan en tal CDM.

En un aspecto de la presente modalidad, la preparación obtenida de usar condiciones adecuadas resulta en una reducción en variantes de proteína de aflibercept y MiniTrampa del VEGF a una cantidad deseada de variantes de proteína de aflibercept y MiniTrampa del VEGF (referido como un “valor objetivo” de variantes de proteína de aflibercept y MiniTrampa del VEGF). En un aspecto adicional de esta modalidad, la preparación obtenida de usar condiciones adecuadas resulta en una reducción en color de las preparaciones a un valor BY deseado (referido como un “valor BY objetivo”) cuando la preparación de la proteína, que incluye variantes de aflibercept y MiniTrampa del VEGF son normalizadas a una concentración de 5 g/L, 10 g/L o aún superior.

En un aspecto adicional de la presente modalidad, el valor BY objetivo y/o valor objetivo de las variantes se puede obtener en una preparación donde el titulador incrementa o no disminuye significantemente (*véase* Ejemplo 5).

En algunas modalidades, las composiciones producidas usando el CDM modificado pueden producir una preparación de proteína anti-VEGF con un valor BY objetivo deseado, en donde el color de la

preparación es caracterizado como sigue:

(i) no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY2;

(ii) no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY3;

(iii) no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY4;

(iv) no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY5;

(v) entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY3;

(vi) entre el Estándar Europeo de Color BY3 y BY4;

(vii) entre el Estándar Europeo de Color BY4 y BY5, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF y en donde una muestra de la composición puede ser obtenida como una muestra a partir de una elución de proteína A de una recolección clarificada. Como se observa en el Ejemplo 9, **Tabla 9-3** abajo, lo eluido de la proteína A que comprende 5 g/L de aflibercept presenta un color amarillo-marrón medido as que tiene un valor b* de 1.77. Tal muestra cuando producido en dirección descendente después de que la AEX tiene un valor b* de 0.50 demostrando la utilidad de AEX para reducir la coloración amarillo-marrón de una muestra (**Tabla 9-3**).

Las composiciones producidas usando el CDM modificado pueden producir una preparación de proteína anti-VEGF, en donde el color de la preparación Es caracterizado por una caracterización de color estándar reconocida en la escala de CIELAB:

(i) no más amarillo-marrón que un valor b* de aproximadamente 22-23;

(ii) no más amarillo-marrón que un valor b* de aproximadamente 16-17;

(iii) no más amarillo-marrón que un valor b* de 9-10;

(iv) no más amarillo-marrón que un valor b* de 4-5;

(v) no más amarillo-marrón que un valor b* de 2-3;

(vi) entre el valor b* de 17-23;

(vii) entre el valor b* de 10-17;

(viii) entre el valor b* de 5-10;

(ix) entre el valor b* de 3-5; o

(x) entre el valor b* de 1-3, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF y en donde la composición se obtiene como una muestra a partir de una elución de proteína A de una recolección clarificada. Véase Ejemplo 9, **Tabla 9-3**.

Para componentes agregados al cultivo celular para formar el CDM modificado, el término “cantidad acumulativa” se refiere a la cantidad total de un componente particular agregado a un biorreactor durante el curso del cultivo celular para formar el CDM, que incluye cantidades agregadas al

comienzo del cultivo (CDM en el día 0) y cantidades subsecuentemente agregadas de los componentes. Cantidades de un componente agregado a un cultivo de tren de siembra o inóculo previo a la producción del biorreactor (*es decir,* previo al CDM en el día 0) también se incluyen cuando se calcula la cantidad acumulativa de los componentes. Una cantidad acumulativa es no afectada por la pérdida de un componente con el tiempo durante el cultivo (por ejemplo, a través del metabolismo o degradación química). De este modo, dos cultivos con las mismas cantidades acumulativas de un componente pueden, no obstante, tener diferentes niveles absolutos, por ejemplo, si el componente se agrega a los dos cultivos a diferentes tiempos (*por ejemplo,* si en un cultivo todos los componentes se agregan al principio, y en otro cultivo el componente se agrega con el tiempo). Una cantidad acumulativa es también no afectada por síntesis *in situ* de un componente con el tiempo durante el cultivo (por ejemplo, mediante metabolismo o conversión química). De este modo, dos cultivos con las mismas cantidades acumulativas de un componente dado pueden, no obstante, tener diferentes niveles absolutos, por ejemplo, si el componente es sintetizado *in situ* en uno de los dos cultivos por medio de un proceso de bioconversión. Una cantidad acumulativa puede ser expresada en unidades tal como, por ejemplo, gramos o moles de los componentes. El término “concentración acumulativa” se refiere a la cantidad acumulativa de un componente, dividida por el volumen del líquido en el biorreactor al comienzo del lote de producción, que incluye la contribución al volumen de partida a partir de cualquier inóculo usado en el cultivo. Por ejemplo, si un biorreactor contiene 2 litros de medio de cultivo celular al comienzo del lote de producción, y un gramo del componente X se agrega en los días 0, 1, 2, y 3, después la concentración acumulativa después del día 3 es 2 g/L (*es decir,* 4 gramos dividido por 2 litros). Sí, en el día 4, un adicional de un litro de líquido que no contiene el componente X se agregan al biorreactor, la concentración acumulativa podría permanecer 2 g/L. Sí, en el día 5, alguna cantidad de líquido se pierden a partir del biorreactor (por ejemplo, a través de la evaporación), la concentración acumulativa podría permanecer 2 g/L. Una concentración acumulativa puede ser expresada en unidades tales como, por ejemplo, gramos por litro o moles por litro.

A. Aminoácidos:

En algunas modalidades, un CDM modificado se puede obtener reduciendo o aumentando las concentraciones acumulativas de aminoácidos en un CDM. Ejemplos no limitantes de tales aminoácidos incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, y valina (o sales de los mismos). El incremento o reducción en la cantidad acumulativa de estos aminoácidos en el CDM modificado puede ser de aproximadamente 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%,

90%, 95%, 100% comparado con el CDM de partida, y varía dentro de uno o más de los precedentes. Alternativamente, el incremento o reducción en la cantidad acumulativa de uno o más aminoácidos en el CDM modificado puede ser de aproximadamente 5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 10% hasta aproximadamente 30%, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 40%, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 50%, aproximadamente 40% hasta aproximadamente 60%, aproximadamente 60% hasta aproximadamente 70%, aproximadamente 70% hasta aproximadamente 80%, aproximadamente 80% hasta aproximadamente 90%, o aproximadamente 90% hasta aproximadamente 100% comparado con el CDM no modificado, y varía dentro de uno o más de los precedentes (*véase* **Figuras 25-27** y Ejemplo 5).

En algunas modalidades, el CDM modificado se puede obtener reduciendo la concentración acumulativa de cisteína en un CDM. La reducción en la cantidad de cisteína en el CDM para formar el CDM modificado puede ser de aproximadamente 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% comparado con el CDM no modificado, y varía dentro de uno o más de los precedentes. Alternativamente, la reducción en la cantidad acumulativa de la cisteína en el CDM modificado puede ser de aproximadamente 5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 10% hasta aproximadamente 30%, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 40%, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 50%, aproximadamente 40% hasta aproximadamente 60%, aproximadamente 60% hasta aproximadamente 70%, aproximadamente 70% hasta aproximadamente 80%, aproximadamente 80% hasta aproximadamente 90%, o aproximadamente 90% hasta aproximadamente 100% comparado con el CDM, y varía dentro de uno o más de los precedentes. En un aspecto, la cantidad de cisteína acumulativa en el CDM modificado es menos de aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 3 mM, aproximadamente 4 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, aproximadamente 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM o aproximadamente 10 mM (*véase* **Figuras 25-27** y Ejemplo 5).

En algunas modalidades, el CDM modificado se puede obtener reemplazando al menos un cierto porcentaje de cisteína cumulativa en un CDM con cisteína. El reemplazo puede ser de aproximadamente 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% comparado con el CDM no modificado, y varía dentro de uno o más de los precedentes. Alternativamente, el reemplazo puede ser de aproximadamente 5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 10% hasta aproximadamente 30%, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 40%, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 50%, aproximadamente 40% hasta aproximadamente 60%, aproximadamente

60% hasta aproximadamente 70%, aproximadamente 70% hasta aproximadamente 80%, aproximadamente 80% hasta aproximadamente 90%, o aproximadamente 90% hasta aproximadamente 100% comparado con el CDM no modificado, y varía dentro de uno o más de los precedentes (*véase* **Figuras 25-27** y Ejemplo 5).

En algunas modalidades, el CDM modificado se puede obtener reemplazando al menos un cierto porcentaje de cisteína cumulativa en un CDM con sulfato de cisteína. El reemplazo puede ser de aproximadamente 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% comparado con el CDM no modificado, y varía dentro de uno o más de los precedentes. Alternativamente, el reemplazo puede ser de aproximadamente 5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 10% hasta aproximadamente 30%, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 40%, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 50%, aproximadamente 40% hasta aproximadamente 60%, aproximadamente 60% hasta aproximadamente 70%, aproximadamente 70% hasta aproximadamente 80%, aproximadamente 80% hasta aproximadamente 90%, o aproximadamente 90% hasta aproximadamente 100% comparado con el CDM no modificado, y varía dentro de uno o más de los precedentes.

B. Metales:

En algunas modalidades, el CDM modificado se puede obtener reduciendo o aumentando concentración acumulativa de metales en un CDM. Ejemplos no limitantes de metales incluyen hierro, cobre, manganeso, molibdeno, zinc, níquel, calcio, potasio y sodio. El incremento o reducción en la cantidad de uno o más metales en el CDM modificado puede ser de aproximadamente 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% comparado con el CDM no modificado, y varía dentro de uno o más de los precedentes. Alternativamente, el incremento o reducción en la cantidad acumulativa de uno o más metales en el CDM modificado puede ser de aproximadamente 5% hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 10% hasta aproximadamente 30%, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 40%, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 50%, aproximadamente 40% hasta aproximadamente 60%, aproximadamente 60% hasta aproximadamente 70%, aproximadamente 70% hasta aproximadamente 80%, aproximadamente 80% hasta aproximadamente 90%, o aproximadamente 90% hasta aproximadamente 100% comparado con el CDM no modificado, y varía dentro de uno o más de los precedentes (*véase* **Figuras 25-27** y Ejemplo 5).

C. Antioxidantes:

En algunas modalidades, el CDM modificado comprende uno o más antioxidantes. Ejemplos no

limitantes de antioxidantes puede incluir taurina, hipotaurina, glicina, ácido tióctico, glutationa, cloruro de colina, hidrocortisona, Vitamina C, Vitamina E y combinaciones de los mismos (*véase* **La Figura 28A-E** y Ejemplo 5).

En algunas modalidades, el CDM modificado comprende aproximadamente 0.01 mM hasta aproximadamente 20 mM de taurina, *es decir,* aproximadamente 0.01 mM hasta aproximadamente 1 mM, aproximadamente 0.01 mM hasta aproximadamente 5 mM, aproximadamente 0.01 mM hasta aproximadamente 10 mM, aproximadamente 0.1 mM hasta aproximadamente 1 mM, aproximadamente 0.1 mM hasta aproximadamente 5 mM, aproximadamente 0.1 mM hasta aproximadamente 10 mM, aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 5 mM, aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 10 mM, y varía dentro de uno o más de los precedentes.

En algunas modalidades, el CDM modificado comprende aproximadamente 0.01 mM hasta aproximadamente 20 mM de hipotaurina, *es decir,* aproximadamente 0.01 mM hasta aproximadamente 1 mM, aproximadamente 0.01 mM hasta aproximadamente 5 mM, aproximadamente 0.01 mM hasta aproximadamente 10 mM, aproximadamente 0.1 mM hasta aproximadamente 1 mM, aproximadamente 0.1 mM hasta aproximadamente 5 mM, aproximadamente 0.1 mM hasta aproximadamente 10 mM, aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 5 mM, aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 10 mM, y varía dentro de uno o más de los precedentes.

En algunas modalidades, el CDM modificado comprende aproximadamente 0.01 mM hasta aproximadamente 20 mM de glicina, *es decir,* aproximadamente 0.01 mM hasta aproximadamente 1 mM, aproximadamente 0.01 mM hasta aproximadamente 5 mM, aproximadamente 0.01 mM hasta aproximadamente 10 mM, aproximadamente 0.1 mM hasta aproximadamente 1 mM, aproximadamente 0.1 mM hasta aproximadamente 5 mM, aproximadamente 0.1 mM hasta aproximadamente 10 mM, aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 5 mM, aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 10 mM, y varía dentro de uno o más de los precedentes.

En algunas modalidades, el CDM modificado comprende aproximadamente 0.01 µM hasta aproximadamente 5 µM de ácido tióctico, *es decir,* aproximadamente 0.01 µM hasta aproximadamente 0.1 µM, aproximadamente 0.1 µM hasta aproximadamente 1 µM, aproximadamente 1 µM hasta aproximadamente 2.5 µM, aproximadamente 1 µM hasta aproximadamente 3 µM, aproximadamente 1 µM hasta aproximadamente 5 µM, y varía dentro de uno o más de los precedentes.

En algunas modalidades, el CDM modificado comprende aproximadamente 0.01 M hasta

aproximadamente 5 mM de glutationa, *es decir,* aproximadamente 0.01 mM hasta aproximadamente 1 mM, aproximadamente 0.1 mM hasta aproximadamente 1 mM, aproximadamente 0.1 mM hasta aproximadamente 5 mM, aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 5 mM, y varía dentro de uno o más de los precedentes.

En algunas modalidades, el CDM modificado comprende aproximadamente 0.01 µM hasta aproximadamente 5 µM de hidrocortisona, *es decir,* aproximadamente 0.01 µM hasta aproximadamente 0.1 µM, aproximadamente 0.1 µM hasta aproximadamente 1 µM, aproximadamente 1 µM hasta aproximadamente 2.5 µM, aproximadamente 1 µM hasta aproximadamente 3 µM, aproximadamente 1 µM hasta aproximadamente 5 µM, y varía dentro de uno o más de los precedentes.

En algunas modalidades, el CDM modificado comprende aproximadamente 1 µM hasta aproximadamente 50 µM de vitamina C, *es decir,* aproximadamente 1 µM hasta aproximadamente 5 µM, aproximadamente 5 µM hasta aproximadamente 20 µM, aproximadamente 10 µM hasta aproximadamente 30 µM, aproximadamente 5 µM hasta aproximadamente 30 µM, aproximadamente 20 µM hasta aproximadamente 50 µM, aproximadamente 25 µM hasta aproximadamente 50 µM, y varía dentro de uno o más de los precedentes.

D. Cambios al Medio para Modular la Glicosilación:

Esta descripción también incluye métodos para modular la glicosilación de una proteína anti-VEGF variando las concentraciones acumulativas de ciertos componentes en un CDM. Con base en las cantidades acumulativas de componentes agregados al CDM, el % total de fucosilación, % total de galactosilación, % total de sialilación y manosa-5 pueden ser variados.

En modalidades ejemplares, el método para modular la glicosilación de una proteína anti-VEGF puede comprender suplementar el CDM con uridina. La proteína anti-VEGF puede tener aproximadamente 40 % hasta aproximadamente 50% de glicanos fucosilados totales, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 55% de glicanos sialilados totales, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 15% de manosa-5, y aproximadamente 60% hasta aproximadamente 79% de glicanos galactosilados. (*Véase* Ejemplo 6 bajo).

En algunas modalidades, el método para modular la glicosilación de una proteína anti-VEGF puede comprender suplementar un CDM con manganeso. En un aspecto, el CDM está desprovisto de manganeso antes de la suplementación. La proteína anti-VEGF puede tener aproximadamente 40 % hasta aproximadamente 50% de glicanos fucosilados totales, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 55% de glicanos sialilados totales, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 15% de manosa-5, y aproximadamente 60% hasta aproximadamente 79% de glicanos galactosilados. (*Véase* Ejemplo 6 bajo).

En algunas modalidades, el método para modular la glicosilación de una proteína anti-VEGF puede comprender suplementar un CDM con galactosa. En un aspecto, el CDM está desprovisto de galactosa antes de la suplementación. La proteína anti-VEGF puede tener aproximadamente 40% hasta aproximadamente 50% de glicanos fucosilados totales, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 55% de glicanos sialilados totales, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 15% de manosa-5, y aproximadamente 60% hasta aproximadamente 79% de glicanos galactosilados. (*Véase* Ejemplo 6 bajo).

En algunas modalidades, el método para modular la glicosilación de una proteína anti-VEGF puede comprender suplementar un CDM con dexametasona. En un aspecto, el CDM está desprovisto de dexametasona antes de la suplementación. La proteína anti-VEGF puede tener aproximadamente 40% hasta aproximadamente 50% de glicanos fucosilados totales, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 55% de glicanos sialilados totales, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 15% de manosa-5, y aproximadamente 60% hasta aproximadamente 79% de glicanos galactosilados. (*Véase* Ejemplo 6 bajo).

En algunas modalidades, el método para modular la glicosilación de una proteína anti-VEGF puede comprender suplementar un CDM con uno o más de uridina, manganeso, galactosa y dexametasona. En un aspecto, el CDM está desprovisto de uno o más de uridina, manganeso, galactosa y dexametasona antes de la suplementación. La proteína anti-VEGF puede tener aproximadamente 40% hasta aproximadamente 50% de glicanos fucosilados totales, aproximadamente 30% hasta aproximadamente 55% de glicanos sialilados totales, aproximadamente 2% hasta aproximadamente 15% de manosa-5, y aproximadamente 60% hasta aproximadamente 79% de glicanos galactosilados. (*Véase* Ejemplo 6 bajo).

V. Preparación de Composiciones Usando Tecnologías de Proceso en Dirección Descendente

Las composiciones que comprenden una proteína anti-VEGF de la invención se pueden producir modulando las condiciones durante la producción de proteína en dirección descendente. Los inventores descubrieron que optimizar los procedimientos en dirección descendente puede conducir a minimización de ciertas variantes de la proteína anti-VEGF, así como también decoloración. La optimización de los procesos en dirección descendente puede producir una composición variante de oxo reducidas, así como también a características de color optimizadas.

Las tecnologías de procesos en dirección descendente pueden ser usadas solas o en combinación con las tecnologías de proceso en dirección ascendente descritas en la Sección IV, *supra*.

A. Cromatografía de Intercambio Aniónico:

En algunas modalidades, una composición de la invención puede involucrar un proceso que

comprende: expresar una proteína anti-VEGF en una célula hospedera en un CDM, en donde la proteína anti-VEGF es secretada a partir de la célula hospedera en el medio y se obtiene una recolección clarificada. La recolección se somete a las siguientes etapas: (a) cargar una muestra biológica obtenida a partir de la recolección sobre una columna de cromatografía de intercambio aniónico (AEX); (b) lavar la columna de AEX con un amortiguador de lavado adecuado, (c) recolectar la(las) fracción(es) de flujo continuo, opcionalmente, (d) lavar la columna con un amortiguador de extracción adecuado y (e) recolectar las fracciones extraídas.

Las fracciones de flujo continuo pueden comprender variantes de oxo de la proteína anti-VEGF las cuales son aproximadamente 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la muestra de proteína anti-VEGF cuando se compara con las variantes de oxo en la fracción extraída de la columna de cromatografía de intercambio aniónico. Por ejemplo, con referencia a la **Tabla 9-5** y **Tabla 9-6**, las fracciones de flujo continuo comprenden variantes de proteína anti-VEGF oxidadas donde varios residuos de histidina y triptofano son aproximadamente 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% (y varía dentro de uno o más de los precedentes) oxididados cuando se compara contra las variantes oxidadas en las fracciones extraídas.

El pH de tanto los amortiguadores de equilibrio como lavado para la columna de AEX puede ser desde aproximadamente 8.20 hasta aproximadamente 8.60. En otro aspecto, la conductividad de tanto los amortiguadores de equilibrio como lavado para la columna de AEX puede ser desde aproximadamente 1.50 hasta aproximadamente 3.0 mS/cm. En un aspecto, los amortiguadores de equilibrio y lavado pueden ser de aproximadamente 50 mM de clorhidrato de Tris. En un aspecto, el amortiguador de extracción comprende 2M de cloruro de sodio o 1N de hidróxido de sodio o ambos (*véase* **Tabla 2-2**). El Ejemplo 2 ilustra, además, optimizar la concentración y conductividad de los amortiguadores de equilibrio y lavado.

Las variantes de proteína pueden incluir modificaciones de uno o más residuos como sigue: una o más asparaginas son desamidadas; uno o más ácido aspárticos son convertidos a iso-aspartato y/o Asn; una o más metioninas son oxidadas; uno o más triptofanos son convertidos a N-formilcinurenina; uno o más triptofanos son mono-hidroxil triptofano; uno o más triptofanos son di-hidroxil triptofano; uno o más triptofanos son tri-hidroxil triptofano; una o más argininas son convertidas a Arg 3-desoxiglucosona; la glicina C-terminal no está presente; y/o existen uno o más glicositos no glicosilados.

La proteína de interés puede ser aflibercept, anticuerpo anti-VEGF o a MiniTrampa del VEGF. Las variantes de proteína pueden ser formadas por uno o más de (i) oxidación de histidinas a partir de los residuos de histidina seleccionados a partir de His86, His110, His145, His209, His95, His19 y/o

His203 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); (ii) oxidación de residuos de triptofano seleccionados a partir de residuos de triptofano en Trp58 y/o Trp138 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); (iii) oxidación de residuo de tirosina en Tyr64 (o posiciones equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); (iv) oxidación de residuos de fenilalanina seleccionados a partir de Phe44 y/o Phe166 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept); y/o (v) oxidación de residuos de metionina seleccionados a partir de Met10, Met 20, Met163 y/o Met192 (o posiciones de residuo equivalentes en proteínas que comparten ciertas características estructurales de aflibercept).

Las fracciones de flujo continuo pueden comprender uno o más de los siguientes:

(a) un porcentaje de residuos de histidina los cuales han sido oxidados a 2-oxo-histidina en donde su caracterización de color es como sigue:

(i) no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY2;

(ii) no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY3;

(iii) no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY4;

(iv) no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY5;

(v) entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY3;

(vi) entre el Estándar Europeo de Color BY3 y BY4;

(vii) entre el Estándar Europeo de Color BY4 y BY5, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF, y en donde la composición se obtiene como una muestra a partir de las fracciones de flujo continuo.

(b) un porcentaje de residuos de histidina los cuales han sido oxidados a 2-oxo-histidina. Además, su color es caracterizado porque tiene un color amarillo-marrón el cual se aproxima a aquel de BY2, BY3, BY4, BY5, BY6, BY7; o es no más oscuro/más intenso que BY2, no más oscuro que BY3, no más oscuro que BY4, no más oscuro que BY5, no más oscuro que BY6, no más oscuro que BY7; o está entre aquel de BY2 y BY3, entre aquel de BY2 y BY4, entre aquel de BY3 y BY4 o entre aquel de BY3 y BY5.

(c) un porcentaje de residuos de histidina los cuales han sido oxidados a 2-oxo-histidina en donde su color es caracterizado por un color en el espacio de color L*, a*, b* de CIE es como sigue:

(i) no más amarillo-marrón que un valor b* de aproximadamente 22-23;

(ii) no más amarillo-marrón que un valor b* de aproximadamente 16-17;

(iii) no más amarillo-marrón que un valor b* de 9-10;

(iv) no más amarillo-marrón que un valor b* de 4-5;

(v) no más amarillo-marrón que un valor b* de 2-3;

(vi) entre el valor b* de 17-23;

(vii) entre el valor b* de 10-17;

(viii) entre el valor b* de 5-10;

(ix) entre el valor b* de 3-5; o

(x) entre el valor b* de 1-3, en donde la composición comprende aproximadamente 5 g/L o aproximadamente 10 g/L de la proteína anti-VEGF y en donde la composición se obtiene como una muestra a partir de las fracciones de flujo continuo.

no más de aproximadamente 1%, no más de aproximadamente 0.1% o aproximadamente 0.1-1%, 0.2-1%, 0.3-1%, 0.4-1%, 0.5-1%, 0.6-1%, 0.7-1%, 0.8-1% o 0.9-1% de residuos de histidina en la composición son oxidados a 2-oxo-histidina. El cálculo de porcentaje se describe en la Sección II.

B. Cromatografía de afinidad:

En algunas modalidades, las composiciones de la invención se pueden producir usando un proceso que comprende: expresar una proteína anti-VEGF en una célula hospedera en donde la proteína anti-VEGF es secretada a partir de la célula hospedera en el medio y se obtiene una recolección clarificada. La recolección se somete a las siguientes etapas, que comprenden (a) cargar una muestra biológica obtenida a partir de la recolección clarificada en una columna de cromatografía de afinidad, en donde la cromatografía de afinidad comprende una proteína capaz de selectivamente o específicamente unirse a la proteína anti-VEGF; (b) lavar la columna de cromatografía de afinidad con un amortiguador de elución adecuado, y (c) recolectar la(s) fracción(es) eluidas. Por ejemplo, como se ejemplifica en la **Tabla 7-1 y Tabla 7-7** hasta **7-10**, usando $VEGF_{165}$ como la proteína capaz de selectivamente o específicamente unirse a la proteína anti-VEGF y recolectar las fracciones eluidas como por el método anterior, conduce a una producción exitosa de MT5 (una proteína anti-VEGF), aflibercept y un fragmento scFv anti-VEGF. La **Tabla 7-1** también describe la producción exitosa de MT5 usando (i) mAb1 (una IgG1 humana de mAb anti-VEGFR1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 73 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 74 es una cadena ligera); (ii) mAb2 (una IgG1 humana de mAb anti-VEGFR1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 75 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 76 es una cadena ligera); (iii) mAb3 (una IgG1 de ratón de mAb anti-VEGFR-R1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 77 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 78 es una cadena ligera) y (iv) mAb4 (una IgG1 de ratón mAb anti-VEGFR1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 79 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 80 es una cadena ligera) como diferentes proteínas capaz de selectivamente o específicamente unirse a MT5.

Con respecto a la etapa (a) anterior, la muestra biológica que será cargada en la columna de afinidad puede venir de una muestra en la cual la recolección clarificada puede ser sometida a cromatografía

previo a la afinidad que incluye, pero no se limita a, cromatografía de intercambio iónico (ya sea anión o catión). Otros procedimientos comatográficos bien conocidos por el experto en la técnica también pueden ser empleados previos al uso de la etapa de afinidad. El punto importante es que una muestra biológica que comprende una proteína anti-VEGF puede ser sometida a cromatografía de afinidad.

En algunas modalidades, las composiciones de la invención se pueden producir usando un proceso que comprende: expresar una proteína de MiniTrampa del VEGF en una célula hospedera en donde la MiniTrampa del VEGF es secretada a partir de la célula hospedera en el medio y en donde el medio puede ser además procesado formando una recolección clarificada. Esta recolección puede ser además procesada por procedimientos cromatográficos conocidos proporcionando una muestra biológica que comprende una MiniTrampa del VEGF. Esta muestra biológica puede ser además procesada empleando las siguientes etapas, que comprende (a) cargar la muestra biológica en una columna de cromatografía de afinidad, en donde la cromatografía de afinidad comprende una proteína capaz de selectivamente o específicamente unirse a, o interactuar con la proteína de MiniTrampa del VEGF; (b) lavar la columna de cromatografía de afinidad con un amortiguador de elución adecuado y (c) recolectar la(s) fracción(es) eluidas. Con referencia nuevamente a la **Tabla 7-1**, descrita en esta Tabla está una producción exitosa de MT5 (MiniTrampa del VEGF) usando (i) $VEGF_{165}$; (ii) mAb1 (una IgG1 humana de mAb anti-VEGFR1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 73 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 74 es una cadena ligera); (iii) mAb2 (una IgG1 humana de mAb anti-VEGFR1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 75 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 76 es una cadena ligera); (iv) mAb3 (una IgG1 de ratón de mAb anti-VEGFR-R1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 77 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 78 es una cadena ligera) y (v) mAb4 (una IgG1 de ratón mAb anti-VEGFR1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 79 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 80 es una cadena ligera) como diferentes proteínas capaz de selectivamente o específicamente unirse a, o de interactuar con MT5.

En una modalidad, la cromatografía de afinidad también puede ser usada para aislar otras proteínas de MiniTrampa. Después de la escisión de un aflibercept, una muestra que comprende el aflibercept escindido puede ser sometida a cromatografía de afinidad usando un aglutinante específico para el aflibercept escindido. En un aspecto, el aglutinante puede ser un anticuerpo o porción del mismo.

La escisión del aflibercept puede ser facilitada usando digestión proteolítica de aflibercept con, por ejemplo, proteasa de IdeS (FabRICATOR) o una variante de la misma para generar la MiniTrampa del VEGF. La escisión del aflibercept con proteasa de IdeS o una variante de la misma puede producir una mezcla de productos que incluyen un fragmento Fc y la MiniTrampa del VEGF. La MiniTrampa del VEGF puede ser además procesada usando una o más de las estrategias de

producción descritas en la presente.

En algunas modalidades ejemplares, una proteína capaz de selectivamente o específicamente unirse (“aglutinante”) a, o interactuar con una proteína anti-VEGF, tal como aflibercept o MiniTrampa, puede originarse a partir de un humano o un ratón.

El proceso de producción de afinidad puede comprender, además, equilibrar una columna de afinidad usando un amortiguador de equilibrio antes de cargar la muestra biológica. Amortiguadores de equilibrio ejemplares pueden ser 20 mM de fosfato de sodio, pH 6-8 (esp. 7.2), 10 mM de fosfato de sodio, 500 mM de NaCl, pH 6-8 (esp. 7.2), 50 mM de Tris pH 7-8, DPBS pH 7.4.

La muestra biológica puede ser cargada usando un amortiguador adecuado, tal como, DPBS.

Este proceso de producción de afinidad puede comprender, además, lavar una columna de afinidad con uno o más amortiguadores de lavado. La columna puede ser lavada una o múltiples veces. Además, los lavados también pueden ser recolectados como fracciones de lavado. El pH de los amortiguadores de lavado puede ser desde aproximadamente 7.0 hasta aproximadamente 8.60. En un aspecto, el amortiguador de lavado puede ser DPBS. En otro aspecto, el amortiguador de lavado puede ser 20 mM de fosfato de sodio, pH 6-8 (esp. 7.2), 10 mM de fosfato de sodio, 500 mM de NaCl, pH 6-8 (esp. 7.2), 50 mM de Tris pH 7-8, o DPBS pH 7.4.

Este proceso de afinidad puede comprender, además, lavar una columna de afinidad con uno o más amortiguadores de elución adecuados y recolectar las fracciones eluidas. La columna puede ser lavada una o múltiples veces. Ejemplos no limitantes de tal amortiguador de elución adecuado incluyen: acetato de amonio (pH de aproximadamente 2.0 hasta aproximadamente 3.0), ácido acético (pH de aproximadamente 2.0 hasta aproximadamente 3.2), glicina-HCl (pH de aproximadamente 2.0 hasta aproximadamente 3.0), citrato de sodio (pH de aproximadamente 2.0 hasta aproximadamente 3.0), ácido cítrico (pH de aproximadamente 2.0 hasta aproximadamente 3.0), isotiocianato de potasio (pH de aproximadamente 2.0 hasta aproximadamente 3.0), o combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos, las fracciones eluidas pueden ser neutralizadas usando un amortiguador neutralizante. Un ejemplo de tal amortiguador neutralizante es Tris a Tris-HCl (pH de aproximadamente 7.0 hasta aproximadamente 9.0).

C. Mutantes de IdeS:

La proteasa de IdeS usada para la escisión de una proteína de fusión Fc tal como aflibercept rápidamente perderá su actividad enzimática bajo condiciones de pH básicas, lo cual puede limitar su uso durante la manufactura de MiniTrampa del VEGF. De este modo, se han desarrollado variantes para ser más estable a pH básico, por ejemplo, en la presencia de una base fuerte tal como NaOH. Tales condiciones básicas pueden ser 0.05N NaOH por 1 hr o 0.1N NaOH por 0.5 hr.

En algunas modalidades, un mutante de IdeS puede tener una secuencia de aminoácido que comprende al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia sobre su longitud completa a las secuencias de aminoácido expuestas en el grupo que consiste en la SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15 y la SEQ ID NO.: 16. En algunos aspectos, la secuencia de aminoácido tiene aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o aproximadamente 100% de identidad de secuencia sobre su longitud completa a las secuencias de aminoácido mencionadas directamente anteriormente.

En algunas modalidades, un mutante de IdeS pueden tener una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácido que comprende al menos 70% de identidad de secuencia sobre su longitud completa a las secuencias de aminoácido como se expone en el grupo que consiste en la SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15 y la SEQ ID NO.: 16. En algunos aspectos, la secuencia de aminoácido tiene aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o aproximadamente 100% de identidad de secuencia sobre su longitud completa a las secuencias de aminoácido mencionadas directamente anteriormente.

En algunas modalidades, el polipéptido puede tener una secuencia de aminoácido que comprende al menos 70% de identidad de secuencia sobre su longitud completa a las secuencias de aminoácido como se expone en el grupo que consiste en la SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15 y la SEQ ID NO.: 16 y se puede expresar por una célula hospedera con un vector adecuado que comprende ácido nucleico que codifica para los péptidos identificados. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico está operativamente ligada a una secuencia de control de expresión capaz de dirigir su expresión en una célula hospedera. En un aspecto, el vector puede ser un plásmido. En algunos aspectos, la secuencia de aminoácido tiene aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o aproximadamente 100% de identidad de secuencia sobre su longitud completa a las secuencias de aminoácido mencionadas directamente anteriormente. En algunos aspectos, una molécula de ácido nucleico aislado puede ser usada para codificar el polipéptido.

En algunas modalidades, un mutante de IdeS puede tener una secuencia de aminoácido que comprende una secuencia de aminoácido parenteral definida por la SEQ ID NO.: 1 (IdeS) con un residuo de asparagina en la posición 87, 130, 182 y/o 274 mutado a un aminoácido distinto de

asparagina. En un aspecto, la mutación puede conferir una estabilidad química incrementada a valores de pH alcalinos comparados con la secuencia de aminoácido parenteral. En otro aspecto, la mutación puede conferir un incremento en la estabilidad química por 50% a valores de pH alcalinos comparados con la secuencia de aminoácido parenteral. En un aspecto, el aminoácido puede ser seleccionado a partir de ácido aspártico, leucina, y arginina. En un aspecto particular, el residuo de asparagina en la posición 87 es mutado a un residuo de ácido aspártico. En otro aspecto particular, el residuo de asparagina en la posición 130 es mutado a un residuo de arginina. En aún otro aspecto particular, el residuo de asparagina en la posición 182 es mutado a un residuo de lisina. En aún otro aspecto particular, el residuo de asparagina en la posición 274 es mutado a un residuo de ácido aspártico. En aún otro aspecto particular, los residuos de asparagina en la posición 87 y 130 son mutados. En aún otro aspecto particular, los residuos de asparagina en la posición 87 y 182 son mutados. En aún otro aspecto particular, los residuos de asparagina en la posición 87 y 274 son mutados. En aún otro aspecto particular, los residuos de asparagina en la posición 130 y 182 son mutados. En aún otro aspecto particular, los residuos de asparagina en la posición 130 y 274 son mutados. En aún otro aspecto particular, los residuos de asparagina en la posición 182 y 274 son mutados. En aún otro aspecto particular, los residuos de asparagina en la posición 87, 130 y 182 son mutados. En aún otro aspecto particular, los residuos de asparagina en la posición 87, 182 y 274 son mutados. En aún otro aspecto particular, los residuos de asparagina en la posición 130, 182 y 274 son mutados. En aún otro aspecto particular, los residuos de asparagina en la posición 87, 130, 182 y 274 son mutados. En algunos aspectos, la secuencia de aminoácido tiene aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o aproximadamente 100% de identidad de secuencia sobre su longitud completa a las secuencias de aminoácido descritas anteriormente. En algunos aspectos, una molécula de ácido nucleico aislado puede ser usada para codificar el polipéptido.

Aquellos de habilidad ordinaria en la técnica familiares con las técnicas de biología molecular estándares puede sin carga indebida, preparar y usar mutantes de IdeS de la presente invención. Las técnicas estándares pueden ser usadas para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótido, cultivo de tejidos, y transformación (*por ejemplo,* electroporación, lipofección). *Véase*, por ejemplo, Sambrook *et al*., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, supra*, la cual se incorpora en la presente por referencia para cualquier propósito. Las reacciones enzimáticas y técnicas de producción pueden ser realizadas de conformidad con las especificaciones del fabricante o como se describe en la presente.

VI. Producción de Proteína en General

Una variedad de diferentes técnicas de producción, incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de afinidad, intercambio iónico, modo mezclado, exclusión de tamaño, e interacción hidrofóbica,

individualmente o en combinación, son contempladas para estar dentro del alcance de la presente invención. Estas etapas cromatográficas separan mezclas de proteínas de una muestra biológica con base en su carga, grado de hidrofobicidad, o tamaño, o una combinación de los mismos, dependiendo de la forma particular de separación. Varias resinas de cromatografía diferentes están disponibles para cada una de las técnicas aludidas *supra*, permitiendo el ajuste exacto del esquema de producción a una proteína particular involucrada. Cada método de separación resulta en la proteína que a traviesa a diferentes velocidades a través de una columna para lograr una separación física que incrementa conforme pasa a través de la columna o se adhiere selectivamente a un medio de separación. Las proteínas son entonces ya sea (i) eluidas diferencialmente usando amortiguador de elución apropiado y/o (ii) recolectadas a través de fracciones de flujo continuo, obtenidas a partir de la columna usada, opcionalmente, a partir de lavar la columna con un amortiguador de equilibrio apropiado. En algunos casos, la proteína de interés es separada de impurezas (HCPs, variantes de proteína, *etc*). Cuando las impurezas se adhieren preferencialmente a la columna y la proteína de interés menos, *es decir,* la proteína de interés no se adsorbe a la fase sólida de una columna particular y de este modo fluye a través de la columna. En algunos casos, las impurezas son separadas de la proteína de interés cuando fallan para adsorberse a la columna y de este modo fluir a través de la columna.

El proceso de producción puede comenzar en la etapa de separación después que la proteína recombinante se ha producido usando métodos de producción en dirección ascendente descritos anteriormente y/o por métodos de producción alternativos convencionales en la técnica. Una vez que una solución o mezcla clarificada que comprende la proteína de interés, por ejemplo, cuando una proteína de fusión se ha obtenido, se realiza separación de la proteína de interés a partir de impurezas relacionadas con el proceso (tal como las otras proteínas producidas por la célula (como HCPs), así como también sustancias relacionadas al producto, tal como variantes acídicas o básicas). Una combinación de una o más técnicas de producción diferentes, que incluyen cromatografía de afinidad, intercambio iónico (*por ejemplo,* CEX, AEX), modo mezclado (MM), y/o de interacción hidrofóbica pueden ser empleadas. Tales etapas de producción separan mezclas de componentes dentro de una muestra biológica con base en, por ejemplo, carga, grado de hidrofobicidad, y/o tamaño aparente. Numerosas resinas de cromatografía son comercialmente disponibles para cada una de las técnicas de cromatografía mencionadas en la presente permitiendo el ajuste exacto del esquema de producción a cada proteína particular involucrada. Cada uno de los métodos de separación permite a las proteínas ya sea viajar a diferentes velocidades a través de una columna logrando una separación física que incrementa conforme pasa además a través de la columna o para adsorberse selectivamente a una resina de separación (o medio). Las proteínas

pueden entonces ser recolectadas diferencialmente. En algunos casos, la proteína de interés se separa de componentes de una muestra biológica cuando otros componentes se adsorben específicamente a una resina de la columna mientras la proteína de interés no lo hace.

A. Recuperación Primaria e Inactivación del Virus

En ciertas modalidades, las etapas iniciales de los métodos de producción descritos en la presente involucran la clarificación y recuperación primaria de una proteína de interés a partir de una muestra biológica. La recuperación primaria incluirá una o más etapas de centrifugación para separar la proteína de interés a partir de una célula hospedera y desechos celulares acompañantes. La centrifugación de la muestra puede ser realizada en, por ejemplo, pero no por medio de limitación, 7,000 x g hasta aproximadamente 12,750 x g. En el contexto de producción a gran escala, tal centrifugación puede ocurrir en línea con una velocidad de flujo establecida para lograr, por ejemplo, un nivel de turbidez de 150 NTU en el sobrenadante resultante. Tal sobrenadante puede entonces ser recolectado para procesamiento adicional o filtrado en línea a través de uno o más filtros profundos para clarificación adicional de la muestra.

En ciertas modalidades, la recuperación primaria puede incluir el uso de una o más etapas de filtración profunda para clarificar la muestra y, de este modo, ayudar en el procesamiento de la proteína de interés. En otras modalidades, la recuperación primaria puede incluir el uso de una o más etapas de filtración profunda post-centrifugación. Ejemplos no limitantes de filtros profundos que pueden ser usados en el contexto de la presente invención incluyen los filtros profundos Millistak+ X0HC, F0HC, D0HC, A1HC, B1HC (EMD Millipore), 3M™ modelo filtros profundos delipid 30/60ZA, 60/90 ZA, VR05, VR07, (3M Corp). Un filtro de 0.2 µm tal como cartuchos de filtro SHR o SHC Millipore Express o bicapa Sartopore™ de 0.45/0.2µm de Sartorius típicamente siguen a los filtros profundos. Otros filtros bien conocidos por aquellos expertos en la técnica también pueden ser usados.

En ciertas modalidades, el proceso de recuperación primaria también puede ser un punto para reducir o inactivar virus que pueden estar presentes en una muestra biológica. Cualquiera o más de una variedad de métodos de reducción/inactivación viral pueden ser usados durante la fase de recuperación primaria de producción que incluye inactivación por calor (pasteurización), inactivación por pH, tratamiento de amortiguador/detergente, radiación UV y rayos-γ y la adición de ciertos agentes de inactivación química tales como β-propiolactona o, por ejemplo, fenantrolina de cobre como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,534,972, las enseñanzas completas de la cual se incorporan en la presente por referencia. En ciertas modalidades ejemplares de la presente invención, la muestra es expuesta a inactivación viral detergente durante la fase de recuperación primaria. En otras modalidades, la muestra puede ser expuesta a inactivación por bajo pH durante

la fase de recuperación de primaria.

En aquellas modalidades donde se emplea la inactivación/reducción viral, una muestra biológica puede ser ajustada, como se necesite, para etapas de producción adicionales. Por ejemplo, después de la inactivación viral a pH bajo, el pH de la muestra se ajusta típicamente a un pH más neutral, por ejemplo, desde aproximadamente 4.5 hasta aproximadamente 8.5, antes de continuar el proceso de producción. Adicionalmente, la mezcla puede ser diluida con agua para inyección (WFI) para obtener una conductividad deseada.

B. Cromatografía de Afinidad

En ciertas modalidades ejemplares, puede ser ventajoso someter una muestra biológica a cromatografía de afinidad para producción de una proteína de interés. El material cromatográfico es capaz de selectivamente o específicamente unirse a, o interactuar con la proteína de interés. Ejemplos no limitantes de tal material cromatográfico incluyen: Proteína A y Proteína G. También, se incluye material cromatográfico que comprende, por ejemplo, una proteína o porción de la misma capaz de unirse a, o interactuar con la proteína de interés. En un aspecto, la proteína de interés es una proteína anti-VEGF tal como aflibercept, MiniTrampa o una proteína relacionada a esta.

La cromatografía de afinidad puede involucrar someter una muestra biológica a una columna que comprende una resina de proteína A adecuada. Cuando se usa en la presente, el término “Proteína A” abarca la Proteína A recuperada a partir de una fuente nativa de la misma, Proteína A producida sintéticamente (*por ejemplo,* por síntesis peptídica o por técnicas recombinantes), y variantes de la misma, las cuales retienen la capacidad para unirse a proteínas las cuales tienen una región C_H2/C_H3. En ciertos aspectos, una resina de proteína es útil para producción a base de afinidad y aislamiento de una variedad de isotipos de anticuerpo que interactúa específicamente con la porción Fc de una molécula debe poseer tal región.

Existen varias fuentes comerciales para resina de Proteína A. Una resina adecuada es MabSelect™ de GE Healthcare. Las resinas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, MabSelect SuRe™, MabSelect SuRe LX, MabSelect, MabSelect SuRe pcc, MabSelect Xtra, rProteína A Sefarosa de GE Healthcare, ProSep HC, ProSep Ultra, y ProSep Ultra Plus de EMD Millipore, MapCapture de Life Technologies. Un ejemplo no limitante de una columna adecuada empacada con MabSelect™ es una columna de aproximadamente 1.0 cm de diámetro x aproximadamente 21.6 cm de largo (17 mL de volumen del lecho). Una columna adecuada puede comprender una resina tal como MabSelect™ SuRe o una resina análoga. La Proteína A también puede ser adquirida comercialmente de Repligen, Pharmacia and Fermatech.

Una columna de afinidad puede ser equilibrada con un amortiguador adecuado previo a cargar la muestra. Después de cargar la columna, la columna puede ser lavada una o múltiples veces usando

un amortiguador de lavado adecuado. La columna puede entonces ser eluida usando un amortiguador de elución apropiado, por ejemplo, glicina-HCl, ácido acético, o ácido cítrico. Lo eluido puede ser monitoreado usando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica tal como un detector UV. Las fracciones eluidas de interés pueden ser recolectadas y después preparadas para procesamiento adicional.

En un aspecto, lo eluido puede ser sometido a inactivación viral, por ejemplo, ya sea por detergente o pH bajo. Una concentración detergente o pH adecuada (y tiempo) puede ser seleccionada para obtener un resultado viral de inactivación deseada. Después de la inactivación viral, lo eluido es usualmente ajustado de pH y/o conductividad para etapas de producción subsecuentes.

Lo eluido puede ser sometido a filtración a través de un filtro profundo para remover la turbidez y/o varias impurezas a partir de la proteína de interés previo a las etapas de pulido cromatográficas adicionales. Ejemplos de filtros profundos adecuados incluyen, pero no se limitan a, filtros Millistak+ XOHC, FOHC, DOHC, AIHC, X0SP, y BIHC Pod (EMD Millipore), o filtros Zeta Plus 30ZA/60ZA, 60ZA/90ZA, delipid, VR07, y VR05 (3M). El filtro de mecanismo múltiple Purificador Híbrido de AEX Emphaze también puede ser usado para clarificar la elución. La combinación eluida puede necesitar ser ajustada a un pH y conductividad particular con el fin de obtener remoción de impurezas deseadas y recuperación del producto a partir de la etapa de filtración profunda.

C. Cromatografía de Intercambio Aniónico

En ciertas modalidades, una proteína de interés se produce sometiendo una muestra biológica con al menos una etapa de separación de intercambio aniónico. En un escenario, la etapa de intercambio aniónico puede ocurrir después de un procedimiento de cromatografía de afinidad (*por ejemplo,* afinidad de Proteína A). En otros escenarios, la etapa de intercambio aniónico puede ocurrir antes de la etapa de cromatografía de afinidad. En aún otros protocolos, el intercambio aniónico puede ocurrir antes y después de una etapa de cromatografía de afinidad. En un aspecto, la proteína de interés es ya sea aflibercept o MiniTrampa.

El uso de un material de intercambio aniónico contra un material de intercambio catiónico se basa, en parte, en las cargas locales de la proteína de interés. La cromatografía de intercambio aniónico puede ser usada en combinación con otros procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de interacción hidrofóbica, así como también otros modos de cromatografía conocidos por el experto en la técnica.

En la realización de una separación, la composición de proteína inicial (muestra biológica) puede ser puesta en contacto con un material de intercambio aniónico usando cualquiera de una variedad de técnicas, por ejemplo, usando una técnica de producción por lotes o una técnica cromatográfica.

En el contexto de producción de lotes, el material de intercambio aniónico se prepara en, o equilibra

a, un amortiguador de partida deseado. Después de la preparación, se obtiene una suspensión del material de intercambio aniónico. La muestra biológica se pone en contacto con la suspensión para permitir la adsorción de proteína al material de intercambio aniónico. Una solución que comprende especies acídicas que no se une al material AEX se separa de la suspensión permitiendo a la suspensión sedimentar y remover el sobrenadante. La suspensión puede ser sometida a una o más etapas de lavado y/o etapas de elución.

En el contexto de separación cromatográfica, una columna cromatográfica se usa para alojar el material de soparte cromatográfico (resina o fase sólida). Una muestra que comprende una proteína de interés se carga sobre una columna cromatográfica particular. La columna puede entonces ser sometida a una o más etapas de lavado usando un amortiguador de lavado adecuado. Los componentes de una muestra que no se han adsorbido sobre la resina probablemente fluirán a través de la columna. Los componentes que se han adsorbido a la resina pueden ser eluidos diferencialmente usando un amortiguador de elución apropiado.

Una etapa de lavado se realiza típicamente en cromatografía de AEX usando condiciones similares a las condiciones de carga o alternativamente reduciendo el pH y/o incrementando la intensidad/conductividad iónica del lavado en una manera por etapas o de gradiente lineal. En un aspecto, la solución de sal acuosa usada en tanto la carga como el amortiguador de lavado tiene un pH que está en, o cerca del punto isoeléctrico (pI) de la proteína de interés. Típicamente, el pH es aproximadamente 0 hasta 2 unidades superior o inferior que el pI de la proteína de interés, sin embargo puede estar en el intervalo de 0 hasta 0.5 unidades superior o inferior. También puede estar en el pI de la proteína de interés.

El agente aniónico puede ser seleccionado a partir del grupo que consiste en acetato, cloruro, formiato y combinaciones de los mismos. El agente catiónico puede ser seleccionado a partir del grupo que consiste en Tris, arginina, sodio y combinaciones de los mismos. En un ejemplo particular, la solución amortiguadora es un amortiguador de Tris/formiato. El amortiguador puede ser seleccionado a partir del grupo que consiste en piridina, piperazina, L- histidina, Bis-Tris, Bis-Tris propano, imidazol, N-etilmorfolina, TEA (trietanolamina), Tris, morfolina, N-metildietanolamina, AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol), dietanolamina, etanolamina, AMP (2-amino-2-metil-1-propaol), piperazina, 1,3-diaminopropano y piperidina.

Una columna de cromatografía de intercambio aniónico empacada, dispositivo de membrana de intercambio aniónico, dispositivo monolítico de intercambio aniónico, o medio de filtro profundo pueden ser operados ya sea en modo de unión-elución, modo de flujo continuo, o un modo híbrido en donde las proteínas presentan unión al material cromatográfico y aún pueden ser lavadas de tal material usando un amortiguador que es el mismo o sustancialmente similar al amortiguador de

carga.

En el modo de unión-elución, un dispositivo de columna o membrana es primero acondicionado con un amortiguador con intensidad iónica y pH apropiados bajo condiciones donde ciertas proteínas adsorberán a la matriz a base de resina. Por ejemplo, durante la carga de alimentación, una proteína de interés puede ser adsorbida a la resina debido a la atracción electrostática. Después de lavar la columna o el dispositivo de membrana con el amortiguador de equilibrio u otro amortiguador con un pH y/o conductividad diferente, la recuperación del producto se logra incrementando la intensidad iónica (*es decir,* conductividad) del amortiguador de elución para competir con el soluto para los sitios cargados de la matriz de intercambio aniónico. Cambiar el pH y de este modo alterar la carga del soluto, es otra forma para lograr la elución del soluto. El cambio en conductividad o pH puede ser gradual (elución de gradiente) o por etapas (elución por etapas).

En el modo de flujo continuo, un dispositivo de membrana o columna es operado a un pH y conductividad seleccionados de manera que la proteína de interés no se une a la resina o la membrana mientras las especies acídicas ya sea serán retenidas en la columna o tendrán un perfil de elución distinto comparado con la proteína de interés. En el contexto de esta estrategia, las especies acídicas interactúan con, o se unen al material cromatográfico bajo condiciones adecuadas mientras la proteína de interés y ciertos agregados y/o fragmentos de la proteína de interés fluirán a través de la columna.

Ejemplos no limitantes de resinas de intercambio aniónico incluyen grupos dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amina cuaternaria (Q). Ejemplos no limitantes adicionales incluyen: Poros 50PI y Poros 50HQ, los cuales son una perlilla polimérica rígida con una estructura que consiste en poli[estireno-divinilbenceno]reticulados; Capto Q Impres y Capto DEAE, los cuales son perlillas de agarosa de flujo alto; Toyopearl QAE-550, Toyopearl DEAE-650, y Toyopearl GigaCap Q-650, los cuales son una perlilla de base polimérica; Fractogel® EMD TMAE Hicap, el cual es una resina polimérica sintética con un intercambiador iónico de tentáculos; Sartobind STIC® PA nano, el cual es una membrana cromatográfica tolerante a la sal con un ligando de amina primaria; Sartobind Q nano; el cual es una membrana cromatográfica de intercambio aniónico fuerte; CUNO BioCap; el cual es un medio de filtro profundo zeta-plus construido de auxiliares de filtro inorgánico, celulosa refinada, y una resina de intercambio iónico; y XOHC, el cual es un medio de filtro profundo construido de auxiliar de filtro inorgánico, celulosa, y ésteres de celulosa mezclados.

En ciertas modalidades, la carga de proteína de una muestra puede ser ajustada a una carga de proteína total a la columna de entre aproximadamente 50 g/L y aproximadamente 500 g/L, o entre aproximadamente 75 g/L y aproximadamente 350 g/L, o entre aproximadamente 200 g/L y aproximadamente 300 g/L. En otras modalidades, la concentración de proteína de la mezcla de

proteína de carga se ajusta a una concentración de proteína del material cargado a la columna de aproximadamente 0.5 g/L y aproximadamente 50 g/L, entre aproximadamente 1 g/L y aproximadamente 20 g/L, o entre aproximadamente 3 g/L y aproximadamente 10 g/L. En aún otras modalidades, la concentración de proteína de la mezcla de proteína cargada se ajusta a una concentración de proteína del material a la columna de aproximadamente 37 g/L.

Aditivos tales como polietilenglicol (PEG), detergentes, aminoácidos, azúcares, agentes caotrópicos, pueden ser agregados para mejorar el desempeño de la separación para lograr mejor separación, recuperación y/o calidad del producto.

En ciertas modalidades, que incluye aquellas que se refieren a aflibercept y/o MiniTrampa del VEGF, los métodos de la presente invención pueden ser usados para remover selectivamente, reducir significantemente, o remover esencialmente al menos 10% de las variantes de proteína, de este modo produciendo la composición de proteínas que tienen variantes de proteína reducidas.

Las variantes de proteína pueden incluir modificaciones de uno o más residuos como sigue: una o más asparaginas son desamidadas; uno o más ácido aspárticos son convertidos a aspartato-glicina y/o Asn-Gly; una o más metioninas son oxidadas; uno o más triptofanos son convertidos a N-formilcinurenina; uno o más triptofanos son mono-hidroxil triptofano; uno o más triptofanos son di-hidroxil triptofano; uno o más triptofanos son tri-hidroxil triptofano; una o más argininas son convertidas a Arg 3-desoxiglucosona; la glicina C-terminal no está presente; y/o existen uno o más glicositos no glicosilados. El uso de AEX también se observó para reducir las especies acídicas y oxidadas de variantes anti-VEGF en tal eluato de afinidad. Comparado con el eluato de afinidad, después del uso de AEX, la fracción de flujo continuo puede mostrar una reducción de al menos aproximadamente 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, o 5% en especies oxidadas y/o acídicas de variantes anti-VEGF.

Las proteínas variantes de aflibercept y/o MiniTrampa del VEGF pueden incluir uno o más de (i) histidinas oxidadas a partir de los residuos de histidina seleccionados a partir de His86, His110, His145, His209, His95, His19 y/o His203; (ii) residuos de triptofano oxidados seleccionados a partir de residuos de triptofano en Trp58 y/o Trp138; (iii) residuo de tirosina oxidado en Tyr64; (iv) residuos de fenilalanina oxidados seleccionados a partir de Phe44 y/o Phe166; y/o (v) residuos de metionina oxidados seleccionados a partir de Met10, Met 20, Met163 y/o Met192.

D. Cromatografía de Intercambio Catiónico

Las composiciones de la presente invención se pueden producir sometiendo una muestra biológica que comprende una proteína de interés con al menos una etapa de intercambio catiónico (CEX). En ciertas modalidades ejemplares, la etapa de CEX será además de una etapa de AEX y ocurrirá ya sea antes o después de la etapa de AEX. En un aspecto, la proteína de interés es ya sea aflibercept,

MiniTrampa o una molécula relacionada a esta.

El uso de un material de intercambio catiónico contra un material de intercambio aniónico, tal como aquellos materiales de intercambio aniónico discutidos *supra*, se basa, en parte, en las cargas totales de la proteína de interés en una solución dada y las condiciones de separación deseadas. Está dentro del alcance de esta invención emplear una etapa de intercambio catiónico previo al uso de una etapa de intercambio aniónico, o una etapa de intercambio aniónico, previo al uso de una etapa de intercambio catiónico. Además, está dentro del alcance de esta invención emplear solamente una etapa de intercambio catiónico en combinación con otros procedimientos de cromatografía.

En la realización del intercambio catiónico, una muestra que comprende una proteína de interés puede ser puesta en contacto con un material de intercambio catiónico usando cualquiera de una variedad de técnicas, por ejemplo, usando una técnica de producción por lotes o una técnica cromatográfica, como se describe anteriormente por AEX.

Una solución de sal acuosa puede ser usada como tanto una carga como amortiguador de lavado que tiene un pH que es inferior que el punto isoeléctrico (pI) de la proteína de interés. En un aspecto, el pH es aproximadamente 0 hasta 5 unidades inferiores que el pI de la proteína. En otro aspecto, está en el intervalo de 1 a 2 unidades inferiores que el pI de la proteína. En aún otro aspecto, está en el intervalo de 1 a 1.5 unidades inferiores que el pI de la proteína.

En ciertas modalidades, la concentración del agente aniónico en solución de sal acuosa se aumenta o reduce para lograr un pH of entre aproximadamente 3.5 y aproximadamente 10.5, o entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10, o entre aproximadamente 4.5 y aproximadamente 9.5, o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9, o entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 8.5, o entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8, o entre aproximadamente 6.5 y aproximadamente 7.5. En un aspecto, la concentración del agente aniónico se aumenta o reduce en la solución de sal acuosa con el fin de lograr un pH de 5, o 5.5, o 6, o 6.5, o 6.8, o 7.5. Los sistemas amortiguadores adecuados para uso en los métodos de CEX incluyen, pero no se limitan a, formiato de Tris, acetato de Tris, sulfato de amonio, cloruro de sodio, y sulfato de sodio.

En ciertas modalidades, la conductividad y pH de la solución de sal acuosa se ajusta aumentando o reduciendo la concentración de un agente catiónico. En un aspecto, el agente catiónico se mantiene a una concentración que varía desde aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 500 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 350 mM, aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 300 mM, o aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 200 mM. Ejemplos no limitantes del agente catiónico se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste en sodio, Tris, trietilamina, amonio, arginina, y combinaciones de los mismos.

Una columna de cromatografía de intercambio catiónico empacada o un dispositivo de membrana

de intercambio catiónico puede ser operada ya sea en modo de elución-eluato, modo de flujo continuo, o un modo híbrido en donde el producto presenta unión a, o que interactúa con un material cromatográfico aún puede ser lavada a partir de tal material usando un amortiguador que es el mismo o sustancialmente similar al amortiguador de carga (detalles de estos modos son resumidos anteriormente).

Los sustituyentes catiónicos incluyen carboximetilo (CM), sulfoetilo (SE), sulfopropilo (SP), fosfato (P) y sulfonato (S). Los materiales catiónicos adicionales incluyen, pero no se limitan a: Capto SP ImpRes, el cual es una perilla de agarosa de flujo alto; CM Hyper D grado F; el cual es una perlilla recubierta de cerámica y permeada con un hidrogel funcionalizado, 250 - 400 grupos iónicos por µeq/mL; Eshmuno S, la cual es una matriz de base de poliviniléter hidrofílica con 50-100 µeq/mL de capacidad iónica; Nuvia C Prime, el cual es un medio de intercambio catiónico hidrofóbico compuesto de una matriz polimérica hidrofílica altamente reticulada macroporosa 55-75 µε/mL; Nuvia S, el cual tiene una matriz de base UNOsphere con 90 -150 µε/mL grupos iónicos; Poros HS; el cual es una perlilla polimérica rígida con una estructura que consiste en poli[estireno-divinilbenceno] reticulado; Poros XS; el cual es una perlilla polimérica rígida con una estructura que consiste en poli[estireno-divinilbenceno] reticulado; Toyo Pearl Giga Cap CM 650M, el cual es una perlilla de base polimérica con 0.225meq/mL de capacidad iónica; Toyo Pearl Giga Cap S 650M el cual es una perlilla de base polimérica; y Toyo Pearl MX TRP, el cual es una perlilla de base polimérica. Se indica que la cromatografía de CEX puede ser usada con resinas MM, descritas en la presente.

La carga de proteína de una muestra que comprende una proteína de interés se ajusta a una carga de proteína total a la columna de entre aproximadamente 5 g/L y aproximadamente 150 g/L, o entre aproximadamente 10 g/L y aproximadamente 100 g/L, entre aproximadamente 20 g/L y aproximadamente 80 g/L, entre aproximadamente 30 g/L y aproximadamente 50 g/L, o entre aproximadamente 40 g/L y aproximadamente 50 g/L. En ciertas modalidades, la concentración de proteína de la mezcla de proteína de carga se ajusta a una concentración de proteína del material que será cargado sobre la columna de aproximadamente 0.5 g/L y aproximadamente 50 g/L, o entre aproximadamente 1 g/L y aproximadamente 20 g/L.

Aditivos tales como polietilenglicol, detergentes, aminoácidos, azúcares, agentes caotrópicos, pueden ser agregados para mejorar el desempeño de la separación para así lograr mejor separación, recuperación y/o calidad del producto.

En ciertas modalidades, que incluye aquellas que se refieren a aflibercept o anticuerpo anti-VEGF o MiniTrampa del VEGF, los métodos de la presente invención pueden ser usados para remover selectivamente, reducir significantemente, o remover esencialmente todas las variantes de oxo en una muestra donde la proteína de interés esencialmente estará en el flujo continuo de un

procedimiento de CEX mientras las variantes de oxo serán sustancialmente capturadas por el medio de la columna.

E. Cromatografía de Modo Mezclado

La cromatografía de modo mezclado ("MM") también puede ser usada para preparar las composiciones de la invención. La cromatografía de MM también referida en la presente como "cromatografía multimodal", es una estrategia cromatográfica que utiliza un soporte que comprende un ligando que es capaz de proporcionar al menos dos diferentes interacciones con un analito o proteína de interés de una muestra. Uno de estos sitios proporciona un tipo atractivo de interacción de carga-carga entre el ligando y la proteína de interés y el otro sitio proporciona interacción de aceptor-donadora y/o interacciones hidrofóbicas y/o hidrofílicas. Las interacciones de donador-aceptor de electrón incluyen interacciones tales como unión de hidrógeno, π-π, catión- π, transferencia de carga, dipolo-dipolo, dipolo inducido, *etc.*

La resina de columna empleada para una separación de modo mezclado puede ser Capto Adhere. Capto Adhere es un intercambio aniónico fuerte con funcionalidad multimodal. Su matriz base es una agarosa altamente reticulada con un ligando (N-bencil-N-metiletanolamina) que presenta diferentes funcionalidades para interacción, tal como interacción iónica, unión de hidrógeno e interacción hidrofóbica. En ciertos aspectos, la resina empleada para una separación de modo fijo se selecciona a partir de PPA-HyperCel y HEA-HyperCel. Las matrices base de PPA-HyperCel y HEA-HyperCel son celulosa reticulada de alta porosidad. Sus ligandos son fenilpropilamina y hexilamina, respectivamente. La fenilpropilamina y hexilamina ofrecen diferentes opciones de efectividad e hidrofobicidad para separaciones de proteína. Los soportes cromatográficos de modo mezclado adicionales incluyen, pero no se limitan a, Nuvia C Prime, Toyo Pearl MX Trp 650M, y Eshmuno® HCX. En ciertos aspectos, la resina de cromatografía de modo mezclado es comprendida de ligandos acoplados a un soporte orgánico o inorgánico, algunas veces denotado por una matriz de base, directamente o mediante un espaciador. El soporte puede estar en la forma de partículas, tales como partículas esencialmente esféricas, un monolito, filtro, membrana, superficie, capilares, y similares. En ciertos aspectos, el soporte se prepara a partir de un polímero nativo tal como material de carbohidrato reticulado, tal como agarosa, agar, celulosa, dextrano, quitosán, konjac, carragenano, gelano, alginato y similares. Para obtener altas capacidades de adsorción, el soporte puede ser poroso, y los ligandos son entonces acoplados a las superficies externas, así como también a las superficies porosas. Tales soportes poliméricos nativos pueden ser preparados de conformidad con los métodos estándares, tales como gelificación de suspensión inversa (S Hjerten: Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398 (1964), las enseñanzas completas de la cual se incorporan en la presente por referencia). Alternativamente, el soporte puede ser preparado a partir de un polímero

sintético, tal como polímeros sintéticos reticulados, por ejemplo, estireno o derivados de estireno, divinilbenceno, acrilamidas, ésteres de acrilato, ésteres de metacrilato, ésteres de vinilo, vinilamidas, y similares. Tales polímeros sintéticos se pueden producir de conformidad con métodos estándares, véase “Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization” (R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9), 70-75 (1988), las enseñanzas completas de la cual se incorporan en la presente por referencia). Los soportes poliméricos sintéticos o nativos porosos también están disponibles de fuentes comerciales, tales como GE Healthcare, Uppsala, Sweden.

La carga de proteína de una mezcla de muestra biológica que comprende una proteína de interés puede ser ajustada a una carga de proteína total a la columna de entre aproximadamente 25 g/L y aproximadamente 750 g/L, o entre aproximadamente 75 g/L y aproximadamente 500 g/L, o entre aproximadamente 100 g/L y aproximadamente 300 g/L. En ciertas modalidades ejemplares, la concentración de proteína de la mezcla de proteína de carga se ajusta a una concentración de proteína del material cargado a la columna de aproximadamente 1 g/L y aproximadamente 50 g/L, o entre aproximadamente 9 g/L y aproximadamente 25 g/L.

Aditivos tales como polietilenglicol, detergentes, aminoácidos, azúcares, agentes caotrópicos, pueden ser agregados para mejorar el desempeño de la separación, para así lograr mejor separación, recuperación y/o calidad del producto.

En ciertas modalidades, que incluyen aquellas que se refieren a aflibercept y/o MiniTrampa, los métodos de la presente invención pueden ser usados para remover selectivamente, reducir significantemente, o remover esencialmente todo lo PTMs, que incluyen variantes de oxo.

Los métodos para producir la composición de la invención también pueden ser implementados en un modo de cromatografía continua. En este modo, al menos dos columnas son empleadas (referido como una “primera” columna y una “segunda” columna). En ciertas modalidades, este modo de cromatografía continua puede ser realizado de manera que las fracciones eluidas y/o fracciones extraídas que comprenden PTMs, por ejemplo, variantes de oxo, pueden entonces ser cargadas subsecuentemente o concurrentemente sobre la segunda columna (con o sin dilución).

En una modalidad, la elección del medio para modo continuo puede ser una de muchas resinas cromatográficas con grupos funcionales hidrofóbicos pendientes y de intercambio aniónico, medio monolítico, medio adsorbente de membrana, o medio de filtración profunda.

F. Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Las composiciones de la invención también pueden ser preparadas usando cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

En la realización de la separación, una muestra biológica se pone en contacto con un material HIC, por ejemplo, usando una técnica de producción por lotes o usando una cromatografía de membrana

o columna. Previo a procesar la HIC puede ser deseable ajustar la concentración del amortiguador de sal para lograr la unión/interacción de proteína deseada a la resina o la membrana.

Mientras la cromatografía de intercambio iónico depende de la carga local de la proteína de interés para separación selectiva, la cromatografía de interacción hidrofóbica explota las propiedades hidrofóbicas de proteínas para lograr separación selectiva. Los grupos hidrofóbicos en o dentro de una proteína interactúan con grupos hidrofóbicos de resina de cromatografía o una membrana. Típicamente, bajo condiciones adecuadas, a más hidrofóbica es una proteína (o porciones de una proteína), más fuerte interactuará con la columna o la membrana. De este modo, bajo condiciones adecuadas, la HIC puede ser usada para facilitar la separación de impurezas relacionadas al proceso (*por ejemplo,* HCPs) así como también sustancias relacionadas al producto (*por ejemplo,* agregados y fragmentos) de una proteína de interés en una muestra.

Como la cromatografía de intercambio iónico, una columna de HIC o un dispositivo de membrana de HIC también puede ser operada en un modo de elución, un flujo continuo, o un modo híbrido en donde el producto presenta unión a, o que interactúa con un material cromatográfico aún puede ser lavado a partir de tal material usando un amortiguador que es el mismo o sustancialmente similar al amortiguador de carga. (Los detalles de estos modos son resumidos anteriormente en conjunto con el procesamiento de AEX). Como las interacciones hidrofóbicas son más fuertes en alta intensidad iónica, esta forma de separación es convenientemente realizada después de una etapa de elución de sal tal como aquella típicamente usada en conjunto con cromatografía de intercambio iónico. Alternativamente, las sales pueden ser agregadas a una muestra antes de emplear una etapa de HIC. La adsorción de una proteína a una columna de HIC se favorece por altas concentraciones de sal, pero las concentraciones actuales pueden variar sobre un amplio intervalo dependiendo de la naturaleza de la proteína de interés, tipo de sal y el ligando de HIC particular elegido. Varios iones pueden ser arreglados en una así llamada serie solufóbica dependiendo de si promueven las interacciones hidrofóbicas (efectos de desalado) o interrumpen la estructura del agua (efecto caotrópico) y conducen al debilitamiento de la interacción hidrofóbica. Los cationes son clasificados en términos de incrementar los efectos de salación como Ba^{2+}; Ca^{2+}; Mg^{2+}; Li^{+}; Cs^{+}; Na^{+}; K^{+}; Rb^{+}; $NH4^{+}$, mientras los aniones pueden ser clasificados en términos de efecto caotrópico incrementado como PO_4^{3-}; SO_4^{2-}; $CH_3CO_3^{-}$; Cl^{-}; Br^{-}; NO_3^{-}; ClO_4^{-}; I^{-}; SCN^{-}.

En general, sulfatos de Na^{+}, K^{+} o $NH4^{+}$ promueven efectivamente la interacción de ligando-proteína usando HIC. Las sales pueden ser formuladas que influencian la intensidad de la interacción como se da por la siguiente relación: $(NH_4)_2SO_4 > Na_2SO_4 > NaCl > NH_4C1 > NaBr > NaSCN$. En general, las concentraciones de sal de entre aproximadamente 0.75 M y aproximadamente 2 M de sulfato de amonio o entre aproximadamente 1 M y aproximadamente 4 M de NaCl son útiles.

El medio de HIC comprende normalmente una matriz de base (*por ejemplo,* material de copolímero sintético o agarosa reticulada) a la cual los ligandos hidrofóbicos (*por ejemplo,* grupos alquilo o arilo) están acoplados. Un medio de HIC adecuado comprende una resina de agarosa o una membrana funcionalizada con grupos fenilo (*por ejemplo,* un Fenil Sefarosa™ de GE Healthcare o una Membrana de Fenilo Sartorius). Muchas resinas de HIC son comercialmente disponibles. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, Capto Fenilo, Fenil Sepharose™ 6 Fast Flow con baja o alta sustitución, Fenil Sepharose™ de Alto Desempeño, Octil Sefarosa™ de Alto Desempeño (GE Healthcare); Fractogel™ EMD Propil o Fractogel™ EMD Fenil (E. Merck, Germany); columnas de Macro-Prep™ Metil o Macro-Prep™ t-Butilo (Bio-Rad, California); WP HI-Propilo (C3)™ (J. T. Baker, New Jersey); y éter, fenil o butil Toyopearl™ (TosoHaas, PA); ToyoScreen PPG; ToyoScreen Fenil; ToyoScreen Butil; ToyoScreen Hexil; GE HiScreen y Butil FF HiScreen Octil FF.

La carga de proteína de una muestra que comprende una proteína de interés se ajusta a una carga de proteína total a la columna de entre aproximadamente 50 g/L hasta aproximadamente 1000 g/L; aproximadamente 5 g/L y aproximadamente 150 g/L, entre aproximadamente 10 g/L y aproximadamente 100 g/L, entre aproximadamente 20 g/L y aproximadamente 80 g/L, entre aproximadamente 30 g/L y aproximadamente 50 g/L, o entre aproximadamente 40 g/L y aproximadamente 50 g/L. En ciertas modalidades, la concentración de proteína de la mezcla de proteína de carga se ajusta a una concentración de proteína del material que será cargada en la columna de aproximadamente 0.5 g/L y aproximadamente 50 g/L, o entre aproximadamente 1 g/L y aproximadamente 20 g/L.

Debido a que el pH seleccionado para cualquier proceso de producción particular debe ser compatible con la estabilidad y actividad de la proteína, las condiciones de pH particular pueden ser específicas para cada aplicación. Sin embargo, debido a que un pH 5.0-8.5, los valores de pH particulares tienen muy poca significancia en la selectividad final y resolución de una separación de HIC, tales condiciones pueden ser favorecidas. Un incremento en pH debilita las interacciones hidrofóbicas y retención de cambios de proteína más drásticamente a valores de pH arriba de 8.5 o por debajo de 5.0. Además, cambios en la intensidad iónica, la presencia de solventes orgánicos, temperatura y pH (especialmente al punto isoeléctrico, pI, cuando no existe carga de superficie neta) puede impactar la estructura y solubilidad de la proteína y, consecuentemente, la interacción con otras superficies hidrofóbicas, tales como aquellas en el medio de HIC y por lo tanto, en ciertas modalidades, la presente invención incorpora estrategias de producción en donde uno o más de los siguientes son ajustados para lograr la reducción deseada en impurezas relacionadas al proceso y/o sustancias relacionadas al producto.

En ciertas modalidades, los métodos espectroscópicos tales como UV, NIR, FTIR, Fluorescencia,

Raman, pueden ser usados para monitorear la proteína de interés e impurezas en un modo sobre la línea, en línea o dentro de la línea, el cual puede entonces ser usado para controlar el nivel de agregados en el material combinado recolectado a partir del efluente adsorbido de HIC. En ciertas modalidades, los métodos de monitoreo sobre línea, en línea o dentro de la línea pueden ser usados ya sea en la línea efluente de la etapa de etapa de cromatografía en el recipiente de recolección, para permitir lograr la calidad/recuperación del producto deseado. En ciertas modalidades, la señal UV puede ser usada como un subrogado para lograr una calidad/recuperación del producto apropiado, en donde la señal UV puede ser procesada apropiadamente, incluyen, pero no se limitan a, tales técnicas de procesamiento como integración, diferenciación, y promedio de movimiento, de manera que la variabilidad de procesos normales puede ser atendida y se puede lograr la calidad del producto objetivo. En ciertas modalidades, tales mediciones pueden ser combinadas con métodos de dilución en línea de manera que la concentración/conductividad iónica de la carga/lavado puede ser controlada por retroalimentación y por lo tanto, facilitar el control de calidad del producto.

G. Cromatografía de Exclusión de Tamaño

La cromatografía de exclusión de tamaño o filtración de gel depende de la separación de componentes como una función de su tamaño molecular. La separación depende de la cantidad de tiempo en el que las sustancias se gastan en la fase estacionaria porosa comparada con el tiempo en el fluido. La probabilidad de que una molécula residirá en un poro depende del tamaño de la molécula y el poro. Además, la capacidad de una sustancia para permearse en los poros se determina por la movilidad de difusión de las macromoléculas la cual es superior para macromoléculas pequeñas. Macromoléculas muy grandes pueden no penetrar los poros de la fase estacionaria en todas; y, para macromoléculas muy pequeñas la probabilidad de penetración es cercana a la unidad. Mientras los componentes de tamaño molecular más grande se mueven más rápidamente pasando la fase estacionaria, los componentes de tamaño molecular pequeño tienen una longitud de trayectoria más larga a través de los poros de la fase estacionar y son de este modo retenidos más en la fase estacionaria.

El material cromatográfico puede comprender un material de exclusión de tamaño en donde el material de exclusión de tamaño es una resina o membrana. La matriz usada para exclusión de tamaño es preferiblemente un medio de gel inerte el cual puede ser un compuesto de polisacáridos reticulados, por ejemplo, agarosa reticulada y/o dextrano en la forma de perlillas esféricas. El grado de reticulación determina el tamaño de poros que están presentes en las perlillas de gel hinchadas. Las moléculas mayores de un cierto tamaño no entran a las perlillas de gel y de este modo se mueven a través del lecho cromatográfico al más lejano. Las moléculas más pequeñas, tales como

detergente, proteína, ADN y similares, las cuales entran a las perlillas de gel para variar la extensión dependiendo de su tamaño y forma, son retardadas en su pasaje a través del lecho. Las moléculas son de este modo en general, eluidas con el fin de reducir el tamaño molecular.

Las resinas cromatográficas porosas apropiadas para cromatografía de exclusión de tamaño de virus pueden ser elaboradas de dextrosa, agarosa, poliacrilamida, o sílice, las cuales tienen diferentes características físicas. Las combinaciones poliméricas también pueden ser usadas. Más comúnmente usadas son aquellas bajo el nombre comercial, “SEPHADEX” disponible de Amersham Biosciences. Otros soportes de exclusión de tamaño a partir de diferentes materiales de construcción también son apropiados, por ejemplo, Toyopearl 55F (polimetacrilato, de Tosoh Bioscience, Montgomery Pa). y Bio-Gel P-30 Fine (BioRad Laboratories, Hercules, CA).

La carga de proteína de una muestra que comprende una proteína de interés puede ser ajustada a una carga de proteína total a la columna de entre aproximadamente 50 g/L y aproximadamente 1000 g/L; aproximadamente 5 g/L y aproximadamente 150 g/L, entre aproximadamente 10 g/L y aproximadamente 100 g/L, entre aproximadamente 20 g/L y aproximadamente 80 g/L, entre aproximadamente 30 g/L y aproximadamente 50 g/L, o entre aproximadamente 40 g/L y aproximadamente 50 g/L. En ciertas modalidades, la concentración de proteína de la mezcla de proteína de carga se ajusta a una concentración de proteína del material que será cargada en la columna de entre aproximadamente 0.5 g/L y aproximadamente 50 g/L, o entre aproximadamente 1 g/L y aproximadamente 20 g/L.

H. Filtración viral

La filtración viral es una etapa de reducción viral dedicada en un proceso de producción. Esta etapa es usualmente realizada post-pulido cromatográfico. La reducción viral se puede lograr mediante el uso de filtros adecuados que incluyen, pero no se limitan a, Planova 20N™, 50 N o BioEx de Asahi Kasei Pharma, filtros Viresolve™ de EMD Millipore, ViroSart CPV de Sartorius, o filtro Ultipor DV20 o DV50™ de Pall Corporation. Será aparente para uno de habilidad ordinaria en la técnica seleccionar un filtro adecuado para obtener desempeño de filtración deseado.

I. Ultrafiltración/Diafiltración

Ciertas modalidades de la presente invención emplean ultrafiltración y diafiltración para concentrar y formular además una proteína de interés. La ultrafiltración se describe en detalle en: Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications, L. Zeman and A. Zydney (Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1996); y en: Ultrafiltration Handbook, Munir Cheryan (Technomic Publishing, 1986; ISBN No. 87762- 456-9); las enseñanzas completas de las cuales son incorporadas en la presente por referencia. Un proceso de filtración es Filtración de Flujo Tangencial como se describe en el catálogo de Millipore titulado “Pharmaceutical Process Filtration Catalogue” pp. 177-202 (Bedford, Mass.,

1995/96), las enseñanzas completas de la cual se incorporan en la presente por referencia. La ultrafiltración es en general considerada por significar filtración usando filtros con un tamaño de poro menor de 0.1 μιη. Empleando filtros que tienen tal tamaño de poro pequeño, el volumen de la muestra puede ser reducido a través de permeación del amortiguador de muestra a través de los poros de la membrana de filtro mientras las proteínas son retenidas arriba de la superficie de la membrana.

Uno de habilidad ordinaria en la técnica puede seleccionar un dispositivo de filtro de membrana apropiado para la operación de UF/DF. Ejemplos de casetes de membrana adecuados para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, casetes Pellicon 2 o Pellicon 3 con membranas de 10 kD, 30 kD o 50 kD de EMD Millipore, casetes de membrana Kvick 10 kD, 30 kD o 50 kD de GE Healthcare, y casetes Centramate o Centrasette 10 kD, 30 kD o 50 kD de Pall Corporation.

J. Estrategias de Producción Ejemplares

La recuperación primaria puede proceder empleando secuencialmente reducción de pH, centrifugación, y filtración para remover células y desechos celulares (que incluyen HCPs) a partir de una recolección de biorreactor de producción. La presente invención se dirige a someter una muestra biológica que comprende una proteína de interés de la recuperación primaria a una o más etapas de producción, que incluye (en ningún orden particular) AEX, CEX, SEC, HIC y/o MM. Ciertos aspectos de la presente invención incluyen etapas de procesamiento adicional. Ejemplos de procedimientos de procesos adicionales incluyen precipitación de etanol, enfoque isoeléctrico, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina Sefarosa™, cromatografía de intercambio aniónico adicional y/o cromatografía de intercambio catiónico adicional, cromatoenfoque, SDS-PAGE, precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de hidroxiapatito, electroforesis de gel, diálisis, y cromatografía de afinidad (*por ejemplo,* usando Proteína A o G, un anticuerpo, un sustrato específico, ligando o antígeno como el reactivo de captura). En ciertos aspectos, la temperatura de la columna (así como también otros parámetros) puede ser independientemente variada para mejorar la eficiencia de separación y/o rendimiento de cualquier etapa de producción particular.

En ciertas modalidades, el flujo continuo no unido y las fracciones de lavado pueden ser además fraccionadas y una combinación de fracciones que proporcionan una pureza de producto objetivo puede ser combinada.

Las etapas de carga y lavado de columna pueden ser controladas por medición dentro de la línea, en la línea, o fuera de la línea de los niveles de impureza/sustancia relacionados con el producto, ya sea en el efluente de columna, o la combinación recolectada o ambos, para así lograr una calidad de producto objetivo particular y/o rendimiento. En ciertas modalidades, la concentración de carga

puede ser controlada dinámicamente por diluciones en línea o por lotes o continua con amortiguadores u otras soluciones para lograr la división necesaria para mejorar la eficiencia de separación y/o rendimiento.

Ejemplos de tales procedimientos de producción son representados en las **Figuras 5-8**.

La **Figura 5** representa una modalidad ejemplar usada para la producción de aflibercept. Con referencia a la **Figura 5**, el método comprende: (a) expresar aflibercept en una célula hospedera cultivada en un CDM; (b) capturar aflibercept usando un primer soporte de cromatografía, el cual puede incluir resina de afinidad de captura; y (c) contactar al menos una porción de aflibercept con un segundo soporte de cromatografía, el cual puede incluir cromatografía de intercambio aniónico. La etapa (c) puede comprender, además, lavar una columna de AEX y recolectar la(s) fracción(es) de flujo continuo de una muestra que comprende aflibercept. Opcionalmente, la etapa (c) puede comprender extraer el segundo soporte cromatográfico y recolectar las fracciones extraídas. Las etapas se pueden llevar a cabo por metodología de rutina en conjunto con la metodología mencionada *supra*. Se debe entender que un experto en la técnica podría optar por emplear CEX en lugar de, o además de AEX. En ningún orden particular, las etapas cromatográficas adicionales pueden ser empleadas también que incluyen, pero no se limitan a, HIC y SEC.

Además de la modalidad ejemplar en la **Figura 5**, otras modalidades ejemplares adicionales pueden incluir (d) contactar al menos una porción de tal aflibercept de la etapa (c) con un tercer soporte de cromatografía. En un aspecto, el protocolo puede incluir (e) contactar al menos una porción aflibercept de la etapa (d) con un cuarto soporte de cromatografía. En un aspecto de esta modalidad, el protocolo puede comprender opcionalmente someter la muestra que comprende aflibercept de la etapa (c) a un pH de menos de 5.5. En un aspecto, el presente método comprende una etapa de clarificación previo a la etapa (a).

La **Figura 6** representa una modalidad ejemplar usada para la producción de MiniTrampa del VEGF. Este método comprende: (a) expresar aflibercept en una célula hospedera cultivada en un CDM; (b) capturar aflibercept usando un primer soporte de cromatografía el cual puede incluir resina de cromatografía de afinidad; (c) escindir el aflibercept de este modo removiendo el dominio Fc y formar una muestra que comprende MiniTrampa del VEGF; (d) contactar la muestra de la etapa (c) con un segundo soporte cromatográfico el cual puede ser cromatografía de afinidad y (e) contactar el flujo continuo de la etapa (d) a un tercer soporte de cromatografía el cual puede incluir una cromatografía de intercambio aniónico. La etapa (d) comprende la recolección de fracción(es) de flujo continuo donde debido a la ausencia de un dominio Fc, la MiniTrampa debe residir mientras el aflibercept o cualquier otra proteína que tiene un dominio Fc debe interactuar esencialmente con la columna de afinidad de la etapa (d). Opcionalmente, la etapa (d) puede comprender extraer el tercer soporte

cromatográfico y recolectar las fracciones extraídas. Las etapas se pueden llevar a cabo por metodología de rutina en conjunto con la metodología resumida anteriormente. En ningún orden particular, se pueden emplear etapas cromatográficas adicionales que incluyen, pero no se limitan a, HIC y SEC.

La **Figura 7** representa una modalidad ejemplar para la producción de aflibercept. Este método comprende: (a) expresar aflibercept en una célula hospedera cultivada en un CDM; (b) capturar aflibercept usando un primer soporte de cromatografía, el cual puede incluir cromatografía de intercambio catiónico; y (c) contactar un flujo continuo de la etapa (b) a un segundo soporte de cromatografía el cual puede incluir una cromatografía de intercambio aniónico. Opcionalmente, la etapa (c) puede comprender extraer el segundo soporte cromatográfico y recolectar las fracciones extraídas. Las etapas se pueden llevar a cabo por metodología de rutina en conjunto con protocolos aludidos anteriormente. En ningún orden particular, otros procedimientos cromatográficos pueden ser empleados que incluyen, pero no se limitan a, HIC y SEC.

La **Figura 8** representa una modalidad ejemplar para producir MiniTrampa del VEGF. Este método comprende: (a) expresar aflibercept en una célula hospedera cultivada en un CDM; (b) capturar aflibercept usando un primer soporte de cromatografía el cual puede incluir una cromatografía de intercambio iónico; (c) someter una fracción de flujo continuo de (b) que comprende aflibercept a cromatografía de afinidad; eluir, en donde la elución comprende aflibercept; (d) someter el aflibercept de (c) a una actividad de escisión, por medio del cual el dominio Fc es escindido, de este modo formar la MiniTrampa del VEGF. En un aspecto, el intercambio iónico de la etapa (b) comprende AEX. Alternativamente, la etapa (b) puede comprender CEX. En ningún orden particular, las etapas cromatográficas adicionales pueden ser incluidas, tales como etapas de cromatografía de intercambio iónico adicionales después de la etapa (d), la adición de HIC y/o SEC.

VII. Formulaciones Farmacéuticas que Comprenden las Composiciones

La invención también describe formulaciones que comprenden composiciones anti-VEGF (como se describe anteriormente). Las formulaciones adecuadas para proteínas anti-VEGF incluyen, pero no se limitan a, formulaciones descritas en la Patente Estadounidense No. 7,608,261, Patente Estadounidense No. 7,807,164, Patente Estadounidense No. 8,092,803, Patente Estadounidense No. 8,481,046, Patente Estadounidense No. 8,802,107, Patente Estadounidense No. 9,340,594, Patente Estadounidense No. 9,914,763, Patente Estadounidense No. 9,580,489, Patente Estadounidense No. 10,400,025, Patente Estadounidense No. 8,110,546, Patente Estadounidense No. 8,404,638, Patente Estadounidense No. 8,710,004, Patente Estadounidense No. 8,921,316, Patente Estadounidense No. 9,416,167, Patente Estadounidense No. 9,511,140, Patente Estadounidense No. 9,636,400, y Patente Estadounidense No. 10,406,226, las cuales son todas

incorporadas en la presente por referencia en su totalidad.

Las tecnologías de procesos en dirección ascendente (descritas en la Sección IV, *supra*), y tecnologías de procesos en dirección descendente (descritas en la Sección V, *supra*) pueden ser usadas solas o en combinación entre sí para efectuar la producción de la formulación.

La presente invención describe formulaciones que comprenden composiciones anti-VEGF en asociación con uno o más ingredientes/excipientes, así como también métodos de uso de los mismos y métodos para elaborar tales composiciones. En una modalidad de la invención, una formulación farmacéutica de la presente invención tiene un pH de aproximadamente 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1 o 6.2.

Para preparar formulaciones farmacéuticas para composiciones anti-VEGF, una composición anti-VEGF se mezcla con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1984); Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, et al. (eds). (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds). (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds). (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, N.Y.; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.; las enseñanzas de las cuales se incorporan en la presente por referencia. En una modalidad de la invención, la formulación farmacéutica es estéril.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen una composición anti-VEGF y un portador farmacéuticamente aceptable que incluye, por ejemplo, agua, agentes amortiguadores, preservativos y/o detergentes.

La presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de las composiciones anti-VEGF expuestas en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, en donde la concentración de polipéptido es aproximadamente 40 mg/mL, aproximadamente 60 mg/mL, aproximadamente 80 mg/mL, aproximadamente 90 mg/mL, aproximadamente 100 mg/mL, aproximadamente 110 mg/mL, aproximadamente 120 mg/mL, aproximadamente 130 mg/mL, aproximadamente 140 mg/mL, aproximadamente 150 mg/mL, aproximadamente 200 mg/mL o aproximadamente 250 mg/mL.

El alcance de la presente invención incluye composiciones desecadas, por ejemplo, liofilizadas que comprenden una proteína anti-VEGF y sustancialmente un portador farmacéuticamente aceptable (aproximadamente 85% hasta aproximadamente 99% o más) que carece de agua.

En una modalidad, un agente terapéutico adicional que es administrado a un sujeto en asociación con una composición anti-VEGF descrita en la presente se administra al sujeto de conformidad con la Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57th edition (nov. 1, 2002), las enseñanzas de la cual se incorpora en la presente por referencia).

La presente invención proporciona un recipiente (*por ejemplo,* un vial de plástico o vidrio con una tapa o una columna de cromatografía, aguja de perforación hueca o un cilindro de jeringa) que comprende cualquiera de las composiciones anti-VEGF o una formulación farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable descrito en la presente. La presente invención también proporciona un dispositivo de inyección que comprende la composición anti-VEGF o formulación expuesta en la presente, por ejemplo, una jeringa, una jeringa prellenada o un autoinyector. En un aspecto, el recipiente es teñido (*por ejemplo,* marrón) para bloquear la luz, natural o de otro modo.

La presente invención incluye combinaciones que incluyen composiciones anti-VEGF en asociación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. La composición anti-VEGF y el agente terapéutico adicionales pueden estar en una composición única o en composiciones separadas. Por ejemplo, el agente terapéutico es un inhibidor de Ang-2 (*por ejemplo,* nesvacumab), un activador del receptor Tie-2, un anticuerpo anti-PDGF o fragmento del mismo de unión al antígeno, un receptor anti-PDGF o anticuerpo beta del receptor PDGF o fragmento del mismo de unión al antígeno y/o un antagonista del VEGF adicional tal como aflibercept, conbercept, bevacizumab, ranibizumab, un aptámero anti-VEGF tal como pegaptanib (*por ejemplo,* pegaptanib sódico), un anticuerpo anti-VEGF de cadena única (*por ejemplo,* VL-VH) tal como brolucizumab, un DARPin anti-VEGF tal como Abicipar Pegol DARPin, un anticuerpo anti-VEGF biespecífico, por ejemplo, el cual también se une a ANG2, tal como RG7716, o una forma soluble del receptor-3 del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGFR-3) que comprende dominios extracelulares 1-3, expresados como una proteína de fusión Fc.

VIII. Métodos de Tratamiento

La presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir un cáncer (*por ejemplo,* cuyo crecimiento y/o metástasis es mediada, al menos en parte, por VEGF, por ejemplo, angiogénesis mediada por el VEGF) o un trastorno ocular angiogénico, en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones como se describen en la presente (Sección III *supra*).

Tecnologías del proceso en dirección ascendente (Sección IV *supra*), tecnologías de procesos en dirección descendente (Secciones V y VI *supra*) pueden ser usadas solas o en combinación entre sí para producir las composiciones como se describe en la Sección III y/o las formulaciones

como se describe en la Sección VII, las cuales pueden ser usadas para tratar o prevenir una variedad de trastornos que incluyen enfermedades oftalmológicas y oncológicas.

La presente invención también proporciona un método para administrar las composiciones expuestas en la presente (Sección III y Sección VII) a un sujeto (*por ejemplo,* un humano) que comprende introducir las composiciones con aproximadamente 0.5 mg, 2 mg, 4 mg, 6 mg, 8 mg, 10 mg, 12 mg, 14 mg, 16 mg, 18 mg o 20 mg de la proteína de interés (*por ejemplo,* aflibercept o MiniTrampa) en no más de aproximadamente 100 µL, por ejemplo, aproximadamente 50 µL, aproximadamente 70 µL o aproximadamente 100 µL, y opcionalmente un agente terapéutico adicional, en el cuerpo del sujeto mediante, por ejemplo, inyección intraocular tal como por inyección intravítrea.

La presente invención proporciona un método para tratar cáncer cuyo crecimiento y/o metástasis es mediada, al menos en parte, por VEGF, por ejemplo, angiogénesis mediada por VEGF o un trastorno ocular angiogénico en un sujeto en necesidad del mismo, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones expuestas en la presente (Sección III y Sección VII anteriores), por ejemplo, 2 mg, 4 mg, 6 mg, 8 mg o 10 mg de la proteína de interés, en no más de aproximadamente 100 µl, y opcionalmente un agente terapéutico adicional, a un sujeto. En una modalidad de la invención, la administración se hace por inyección intravítrea. Ejemplos no limitantes de trastornos oculares angiogénicos que son tratables o prevenibles usando los métodos de la presente, incluyen:

- degeneración macular relacionada con la edad (*por ejemplo,* húmeda o seca),
- edema macular,
- edema macular después de oclusión de la vena retinal,
- oclusión de la vena retinal (RVO),
- oclusión de la vena retinal central (CRVO),
- oclusión de la vena retinal central ramificada (BRVO),
- edema macular diabético (DME),
- neovascularización coroidal (CNV),
- neovascularización del iris,
- glaucoma neovascular,
- fibrosis postquirúrgica en glaucoma,
- vitreoretinopatía proliferativa (PVR),
- neovascularización del disco óptico,
- neovascularización corneal,
- neovascularización,

- neovascularización vítrea,
- pannus,
- ptergio,
- retinopatía vascular,
- retinopatía diabética en un sujeto con edema macular diabético; y
- retinopatías diabéticas (*por ejemplo,* retinopatía diabética no proliferativa (*por ejemplo,* caracterizada por un nivel de Escala de Severidad de Retinopatía Diabética (DRSS) de aproximadamente 47 o 53) o retinopatía diabética proliferativa; *por ejemplo,* en un sujeto que no sufre de DME).

El modo de administración de tales composiciones o formulaciones (Sección III y Sección VII) puede variar y se puede determinar por un experto en la técnica. Las rutas de administración incluyen parenteral, no parenteral, oral, rectal, transmucosal, intestinal, parenteral; intramuscular, subcutánea, intradermal, intramedularmente, intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, intraocular, inhalación, insuflación, tópica, cutánea, intraocular, intravítrea, transdermal o intra-arterial.

En una modalidad de la invención, la inyección intravítrea de una formulación farmacéutica de la presente invención (la cual incluye a las composiciones o formulaciones de la presente invención) incluye la etapa de perforar el ojo con una jeringa y aguja (*por ejemplo,* aguja de inyección de calibre 30) que comprende la formulación e inyectar la formulación (*por ejemplo,* menos de o igual a aproximadamente 100 microlitros; aproximadamente 40, 50, 55, 56, 57, 57.1, 58, 60 o 70 microlitros) en el vítreo del ojo con un volumen suficiente como para suministrar una cantidad terapéuticamente efectiva como se expone en la presente, por ejemplo, de aproximadamente 2, 4, 6, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 10 o 20 mg de la proteína de interés. Opcionalmente, el método incluye las etapas de administrar un anestésico local (*por ejemplo,* proparacaína, lidocaína o tetracaína), un antibiótico (*por ejemplo,* una fluoroquinolona), antiséptico (*por ejemplo,* povidona-yodo) y/o un agente de dilación de la pupila al ojo que es inyectado. En un aspecto, un campo estéril alrededor del ojo que será inyectado se establece antes de la inyección. Después de inyección intravítrea, el sujeto es monitoreado para elevaciones en la presión intraocular, inflamación y/o presión sanguínea.

Una cantidad efectiva o terapéuticamente efectiva de la proteína de interés para un trastorno ocular angiogénico se refiere a la cantidad de la proteína de interés suficiente para causar la regresión, estabilización o eliminación del cáncer o trastorno ocular angiogénico, por ejemplo, regresando, estabilizando o eliminando uno o más síntomas o indicios del cáncer o trastorno ocular angiogénico por cualquier grado clínicamente medible, por ejemplo, con respecto a un trastorno ocular angiogénico, causando una reducción en, o el mantenimiento del registro de severidad de retinopatía

diabética (DRSS), mejorando o manteniendo la visión (*por ejemplo,* en agudeza visual mejor corregida como se mide por un incremento en letras ETDRS), incrementando o manteniendo el campo visual y/o reduciendo o manteniendo el grosor retinal central y, con respecto al cáncer, detener o invertir el crecimiento, supervivencia y/o metástasis de células de cáncer en el sujeto.

En una modalidad de la invención, una cantidad efectiva o terapéuticamente efectiva de una proteína de interés tal como aflibercept para tratar o prevenir un trastorno ocular angiogénico es aproximadamente 0.5 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 7.25 mg, 7.7 mg, 7.9 mg, 8.0 mg, 8.1 mg, 8.2 mg, 8.3 mg, 8.4 mg, 8.5 mg, 8.6 mg, 8.7 mg, 8.8 mg, 8.9 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg o 20 mg, *por ejemplo,* en no más de aproximadamente 100 µL. La cantidad puede variar dependiendo de la edad y el tamaño de un sujeto que será administrado, enfermedad objetivo, condiciones, ruta de administración, y similares. En ciertas modalidades ejemplares, la dosis inicial puede ser seguida por administración de una segunda o una pluralidad de dosis subsecuentes de la proteína de interés en una cantidad que puede ser de aproximadamente la misma o menos de aquella de la dosis inicial, en donde las dosis subsecuentes son separadas por al menos 1 día hasta 3 días; al menos una semana, al menos 2 semanas; al menos 3 semanas; al menos 4 semanas; al menos 5 semanas; al menos 6 semanas; al menos 7 semanas; al menos 8 semanas; al menos 9 semanas; al menos 10 semanas; al menos 12 semanas; o al menos 14 semanas.

Se indica que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y severidad de la condición que será aliviada. Se entiende además que, para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ser ajustados con el tiempo de conformidad con la necesidad particular y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en la presente son ejemplares solamente y no están propuestos para limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada.

IX. Método para Ensayar las Variantes de Proteína

Los niveles de las variantes de proteína en una muestra cromatográfica producidos usando las técnicas descritas en la presente pueden ser analizados como se describe en los Ejemplos abajo. En ciertas modalidades, se emplea un método de cIEF usando un analizador iCE3 (ProteinSimple) con un cartucho capilar recubierto de fluorocarbono (100 µπι x 5 cm). La solución de anfolito consiste en una mezcla de 0.35% de metilcelulosa (MC), 4% de anfolitos portadores de Pharmalyte 3-10, 4% de anfolitos portadores de Pharmalyte 5-8, 10 mM de HCl de L-Arginina, 24% de formamida, y marcadores de pI 5.12 y 9.77 en agua purificada. El anolito fue 80 mM de

ácido fosfórico, y el catolito fue 100 mM de hidróxido de sodio, ambos en 0.10% de metilcelulosa. Se diluyeron muestras en agua purificada a 10 mg/mL. Las muestras se mezclaron con la solución de anfolito y después se enfocaron introduciendo un potencial 1500 V por un minuto, seguido por un potencial de 3000 V por 7 minutos. Una imagen de las variantes enfocadas se obtiene pasando 280 nm de luz ultravioleta a través del capilar y en los lentes de una cámara digital de dispositivo acoplado a la carga. Esta imagen entonces se analizó para determinar la distribución de las varias variantes de carga. Las personas de habilidad en la técnica pueden variar los parámetros precisos mientras todavía logran el resultado deseado.

Varias publicaciones, que incluyen patentes, solicitudes de patente, solicitudes de patente publicadas, números de acceso, artículos técnicos y artículos escolares son citadas a través de la especificación. Cada una de estas referencias citadas se incorpora por referencia, en su totalidad.

La presente invención será más completamente entendida por referencia a los siguientes ejemplos. No deben, sin embargo, ser construidos como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Las MiniTrampas (MT) 1-6 discutidas en los Ejemplos son como sigue:

MT1: MiniTrampa del VEGF obtenida por escisión de aflibercept producido usando CDM1.

MT2: MiniTrampa del VEGF obtenida por escisión de aflibercept producido usando CDM2.

MT3: MiniTrampa del VEGF obtenida por escisión de aflibercept producido usando CDM3.

MT4: MiniTrampa del VEGF obtenida por escisión de aflibercept producido usando hidrolizado de soya.

MT5: MiniTrampa del VEGF recombinante (dímero).

MT6: MiniTrampa del VEGF recombinante (scFv).

La caracterización de MT1, MT5 y MT6 se describe abajo en el Ejemplo 8.

Evaluación del Color de las Muestras

El método de ensayo espectrofotométrico para medir el valor b* (CIELAB) se encontró adecuado para realizar evaluación de color.

La absorbancia de 1 mL de muestra de proteína se cuantificó sobre el espectro de luz visible (380 hasta 780 nm) y la curva de absorbancia se transformó en el espacio de color CIELAB usando una serie de operaciones de matriz. El instrumento puede procesar aproximadamente 6 muestras por hora. El formato de rendimiento de luz del ensayo usó un lector de placa CLARIOstar (BMG Labtech). Hasta 96 muestras pueden ser analizadas usando una placa de 96 cavidades que requiere 0.3 mL de la muestra.

Para convertir los estándares BY en los valores b*, los estándares de referencia BY (BY1 a BY7) se cuantificaron usando el formato de ensayo de alto rendimiento.

Las soluciones se prepararon como para los estándares BY discutidos anteriormente. El valor b* para cada uno de los estándares se muestra en la **Figura 9**. Este método proporciona un ensayo más rápido con un requerimiento de muestra más pequeño y tiempos de corrida más cortos como se muestra en la **Tabla 3** abajo. Para todas las muestras evaluadas usando este método, la concentración de proteína de las muestras de prueba se estandarizó a ya sea 5 g/L o 10 g/L.

Tabla 3.

	Original	**Alto rendimiento**
Cantidad/Muestra	1 mL	0.3 mL
Formato de Medición	Cubeta (individual)	Placa de 96 cavidades(volumen))
Tiempo de Corrida	6 muestras por hora	96 muestras por 5 minutos
Entrada de Datos	manual	automatizada
Almacenamiento de Datos	Excel	LIMS

Ejemplo 1: Producción de una proteína Usando un medio químicamente definido

1.1 Fuente y Recolecta de Célula

Se empleó una línea de célula para producir aflibercept en el presente estudio. Se cultivaron y recolectaron líneas de célula que produce aflibercept usando medios químicamente definidos (CDM).

1.2 Escisión Proteolítica de Aflibercept

Una columna con una enzima IdeS inmovilizada (FaBRICATOR ® obtenido de Genovis (Cambridege, MA) se usó para generar MT1. El aflibercept obtenido de una recolección de cultivo de célula (20 mg en 1.0 ml de amortiguador de escisión) se agregó a la columna y se incubó por 30 min a 18°C. Después de 30 minutos, la columna se lavó con el amortiguador de escisión (1.0 ml). La mezcla de digestión y soluciones de lavado se combinaron. La mezcla se cargó en y se eluyó de una columna de afinidad de Proteína A analítica (Applied Biosystems™, cartucho de proteína A 20 µM POROS™ 2.1x30 mm, 0.1 ml (# de Cat 2-1001-00)). El proceso se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo Applied Biosystems™ para el cartucho de Proteína A 20 µM 2.1x30 mm, 0.1 mL (# de cat 2-1001-00). La altura de la columna fue 20 ± 1.0 cm, tiempo de residencia fue 15 minutos y se realizó el equilibrio/lavado usando 40 mM de Tris, 54 mM de Acetato a pH 7.0 ± 0.1.

Ejemplo 2. Cromatografía de intercambio aniónico (AEX) para Minimizar el Color

(A) Se empleó AEX para Reducir la Formación de Color

Se realizó la cromatografía AEX para remover la coloración obtenida durante la producción de aflibercept expresado usando CDM1.

2.1 Diseño

Se realizaron cinco separaciones AEX para este estudio como se detalló en la **Tabla 2-1** con el protocolo AEX como se describe en la **Tabla 2-2**. Una columna de Fast Flow de Sefarosa Q de 15.7 ml (19.5 cm de altura de lecho, 1.0 cm I.D.) y una columna de POROS 50 HQ de 14.1 ml (18.0 cm de altura de lecho, 1.0 cm I.D.) se integraron en un controlador de cromatografía líquida de parte superior Avant AKTA.

El pH de carga de AEX se ajustó a objetivo ± 0.05 unidades de pH usando 2M de base Tris o 2 M de ácido acético. La conductividad de carga de AEX se ajustó a objetivo ± 0.1 mS/cm usando 5 M de cloruro de sodio o agua desionizada. Todas las muestras combinadas se analizaron para peso molecular alto (HMW), color y rendimiento.

Tabla 2-1. Sumario del Diseño de Estudio para Reducción del Color AEX

Separación de AEX	Condición evaluada	Resina
1	pH 8.30 – 8.50, 1.90 – 2.10 mS/cm	POROS 50 HQ
2	pH 7.90 – 8.10, 2.40 – 2.60 mS/cm	Q Sefarosa FF
3	pH 7.90 – 8.10, 2.40 – 2.60 mS/cm	POROS 50 HQ
4	pH 7.70 – 7.90, 3.90 – 4.10 mS/cm	Q Sefarosa FF
5	pH 7.70 – 7.90, 3.90 – 4.10 mS/cm	POROS 50 HQ

Tabla 2-2. Protocolo AEX para Reducción de Color

Etapa	Descripción	Fase Móvil	Volúmenes de columna (CVs)	Velocidad Lineal (cm/h)
1	Pre-Equilibrio	2 M de cloruro de sodio (NaCl)	2	200
2	Equilibrio	50 mM Tris, mM Variable de NaCl pH Variable y Conductividad	2	200
3	Carga	pH Variable de AEX de carga y Conductividad	40 g/L-resina	200

Etapa	Descripción	Fase Móvil	Volúmenes de columna (CVs)	Velocidad Lineal (cm/h)
4	FT/lavado	50 mM Tris, mM Variable de NaCl pH Variable y Conductividad	2	200
5	extracción 1	2 M de cloruro de sodio (NaCl)	2	200
6	extracción 2	1 N de hidróxido de sodio (NaOH)	2	200

2.2 Resultados

Empleando separaciones AEX para producción exhiben una reducción significante en color. (Tabla 2-3). Por ejemplo, como se observa en la **Tabla 2-3**, el color observado en el flujo continuo (FT) y lavado en separación 1 de AEX (pH 8.30-8.50, 1.90-2.10 mS/cm) tiene un valor b* de 1.05, comparado con el color de la carga para AEX ("Carga de AEX") con un valor b* de 3.06. El incremento en el valor b* refleja la intensidad de coloración amarillo-marrón de una muestra.

Se realizaron cinco separaciones AEX para evaluar el impacto de resina (FF de Sefarosa Q o POROS 50 HQ) y pH y conductividad de punto de ajuste (pH 8.40 y 2.00 mS/cm, pH 8.00 y 2.50 mS/cm, o pH 7.80 y 4.00 mS/cm) en reducción de color. Para POROS 50 HQ, rendimientos (64.4, 81.9 y 91.4%) y niveles de HMW combinados (1.02, 1.29 y 1.83%) incrementados como el punto de ajuste se cargó a un pH inferior y conductividad mayor. También se incrementó el color (valores b*) (1.05, 1.33, y 1.55) como el punto de ajuste se cargó a un pH inferior y conductividad mayor. Los niveles de pH mayores y conductividades inferiores proporcionan la mayor reducción en color sobre la separación AEX por POROS 50 HQ.

Para Flujo Rápido de Sefarosa Q, proporciona (49.5 y 77.7%) y niveles de HMW combinados (0.59 y 1.25%) también se incrementa como el punto de ajuste se cargó a un pH inferior y conductividad mayor. También se incrementó el color (valores b*) (0.96 y 1.35) como el punto de ajuste se cargó a un pH inferior y conductividad mayor.

El uso de AEX reduce la coloración amarillo-marrón - *véase* **Tabla 2-3**. Adicionalmente, se determinó que el Flujo Rápido de Sefarosa Q reduce el color más que POROS 50 HQ para los dos puntos de ajuste evaluados en ambas resinas. A pH 8.00 y 2.50 mS/cm de punto de ajuste, la combinación de POROS 50 HQ tiene un valor b* de 1.33 mientras la combinación de Flujo Rápido de Sefarosa Q

tiene un valor b* de 0.96. De manera similar, a pH 7.80 y punto de ajuste de 4.00 mS/cm, la combinación de POROS 50 HQ tiene un valor b* de 1.55 mientras la combinación de Flujo Rápido de Sefarosa Q tiene un valor b* de 1.35 **(Tabla 2-3)**.

Tabla 2-3. Sumario de Resultados Experimentales del Estudio de Reducción de Color AEX

Separación de AEX	Fracción	Rendimiento (%)	HMW (%)	Color (L*)	Color (a*)	Color (b*)
1	FT/lavado	64.4	1.02	98.89	0.01	1.05
2	FT/lavado	49.5	0.59	98.30	-0.03	0.96
3	FT/lavado	81.9	1.29	99.07	-0.07	1.33
4	FT/lavado	77.7	1.25	99.42	-0.04	1.35
5	FT/lavado	91.4	1.83	99.19	-0.09	1.55
-	combinación filtrada (carga de AEX)	-	3.66 – 3.98	98.73	-0.21	3.06

AEX, cromatografía de intercambio aniónico; HMW, especies de peso molecular alto, no aplicables

2.3 Conclusiones

El uso de AEX se encontró por reducir la coloración amarillo-marrón, véase Tabla 2-3. Con referencia a la Tabla 2-3, l carga de AEX tiene un valor b* de 3.06, pero cuando se somete a cromatografía AEX (Separación 1-5 de AEX), el valor b* disminuye indicando una disminución en la coloración amarillo-marrón. De nuevo, ya que el valor disminuye también hace la coloración; ya que el valor b* se incrementa es refractivo del color amarillo-marrón incrementado en una muestra dada.

Se evaluó la reducción en color usando dos resinas AEX (POROS 50 HQ y Flujo Rápido de Sefarosa Q) y tres puntos de ajuste (pH 8.40 y 2.00 mS/cm, Ph 8.00 y 2.50 mS/cm, y pH 7.80 y 4.00 mS/cm). Para ambas resinas, la reducción en color fue mayor para el pH mayor y puntos de ajuste de conductividad inferior. Además, el Flujo Rápido de Sefarosa Q proporciona más reducción en color que POROS 50 HQ en los dos puntos de ajuste evaluados en ambas resinas (pH 8.00 y 2.50 mS/cm y pH 7.80 y 4.00 mS/cm). Sin embargo, todos los cinco métodos de separación AEX conduce a una reducción de color significante cuando se compara a la solución de carga para AEX ("carga de AEX"), demostrando la importancia de producción de AEX en el proceso de producción de aflibercept expresada usando una CDM. El valor b* inicial de la carga de AEX (a una concentración de 10 g/L) puede variar desde aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 30, más particularmente desde aproximadamente 1.0 hasta aproximadamente 25.0, y aún más particularmente desde aproximadamente 2.0 hasta aproximadamente 20.0. Después del uso de AEX, el valor b* para el flujo continuo (a una concentración de 10 g/L) puede variar desde 0.5 hasta aproximadamente 10.0,

más particularmente desde aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 7.0, y aún más particularmente desde aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 5.0.

2.4 Mapeo de Péptido

Preparación de muestra. El mapeo tríptico de muestras de aflibercept alquilado obtenido de carga de AEX y flujo continuo del experimento anterior (Tabla 2-3) se realizaron para identificar y cuantificar modificación post-traduccional (PTM). Una alícuota de cada muestra (Carga y flujo continuo) se desnaturalizó usando 8.0 M de urea, 0.1 M de Tris-HCl, pH 7.5, reducido con DTT y después alquilado con yodoacetamida. La muestra desnaturalizada, reducida y alquilada primero se digirió con Lys-C recombinante (rLys-C) en una enzima a relación de sustrato de 1:100 (p/p) a 37°C por 30 minutos, se diluyó con 0.1M de Tris-HCl, pH 7.5 tal que una concentración de urea final fue 1.8 M, subsecuentemente se digirió con tripsina a una enzima para relación de sustancia de 1:20 (p/p) a 37°C por 2 horas y después se desglicosiló con PNGase F a na relación de sustrato de 1:5 (p/p) por 37°C por 1 hora. La digestión se detuvo llevando el pH por debajo de 2.0 usando ácido fórmico (FA).

Análisis LC-MS. Se separó 20 µg de una alícuota de péptidos rLys-C/tríptico de cada muestra y analizó por cromatografía líquida de ultra-desempeño de fase inversa (UPLC) usando columna Waters ACQUITY UPCL CSH C18 (130 Å, 1.7 µm, 2.1×150 mm) seguido por detección PDA en línea (a longitudes de onda de 280 nm, 320 nm y 350 nm) y análisis de espectrometría de masa. Fase móvil A 0.1% de FA en agua. Y fase móvil B fue 0.1% de FA en acetonitrilo. Después de la inyección de muestra, se inició un gradiente con 5 minutos de mantenimiento a 0.1% de B seguido por un incremento lineal a 35% de B sobre 75 minutos para separación de péptido óptimo. Se condujeron experimentos MS y MS/MS usando un espectrómetro de Thermo Scientific Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap con disociación colisional de alta energía (HCD) empleado por fragmentación de péptido para experimentos MS/MS. Las asignaciones de identidad de péptido se basan en la masa precisa experimentalmente determinada de un péptido dado en el espectro MS completo, así como también iones del fragmento b e y en el correspondiente espectro MS/MS HCD. Se generaron los cromatogramas de ion extraídos de los péptidos de la carga y flujo continuo (véase **FIGURA 10**). Como se observa en el cromatograma de ion extraído en la **FIGURA 10**, se muestran los fragmentos de péptido identificados en "carga de AEX" y "AEX FT/lavado" de las separaciones 1-5 de AEX (como se identifica en la **Tabla 2-3**). La abundancia relativa de algunos de estos péptidos identificados en la **FIGURA 10** del análisis de mapeo de péptido se muestran en la **FIGURA 11.**

Con referencia a la **FIGURA 11**, esta figura identifica varios fragmentos peptídicos analizados y sus niveles relativos de oxidación. En particular, la tercera columna identifica los residuos de aminoácido (“Secuencia Peptídica”) de fragmentos peptídicos que se aislaron y analizaron. Cada Secuencia Peptídica tiene un residuo de aminoácido que está subrayado. El residuo de aminoácido subrayado

identifica el aminoácido en la Secuencia Peptídica que está oxidado. Los aminoácidos oxidados corresponden ya sea con la oxidación de histidina (H) u oxidación de triptofano (W). En esta figura también se representan filas a la derecha de cada una de las Secuencias Peptídicas que muestran la abundancia de especies oxidadas. Este sombreado en las filas indica diferencias en la cantidad relativa de residuos oxidados en una muestra particular usando diferentes separaciones AEX identificadas en los cabezales de columna respectivos. Por ejemplo, con referencia al segundo péptido, (EIGLLTCEATVNGHLYK (SEQ ID NO.: 18) en la **FIGURA 11**, cuando se lee a lo largo en una manera horizontal, la población total con relación de este péptido en una muestra particular ("carga de AEX aflibercept") que es oxidado es aproximadamente 0.013% oxidado. Como se hace el progreso a través de la misma fila, existe un cambio en el sombreado, indicando un cambio en la abundancia relativa de especies oxidadas. Por ejemplo, usando esta Secuencia de Péptido, la abundancia relativa de especies oxidadas para separación AEX son 0.006% a 0.010% cuando se siguen diferentes protocolos de separación AEX. Así, se puede apreciar que la cromatografía AEX disminuye la abundancia de especies oxidadas.

B) AEX se Empleó para Reducir la Formación de Color en Producción de MiniTrampa

Se realizó la cromatografía AEX para remover la coloración obtenida durante la producción de MT1 la cual se obtuvo realizando la escisión de aflibercept de longitud completa usando CDM1.

2.5 Diseño

Se realizaron cuatro separaciones AEX para este estudio como se describe en la Tabla 2-4. La carga de AEX se obtuvo de una muestra de filtración de MT1 ("combinación filtrada de MT1"). Una columna Capto Q de 15.7 ml (altura de lecho 20.0, I.D. 1.0 cm), 14.1 de una columna POROS 50 HQ (altura de lecho 18.0 cm, I.D. 1.0 cm), y 16.5 ml de columna FF de Sefarosa QQ (altura de lecho 21.0 cm), I.D. 1.0 cm) se integraron en un controlador de cromatografía líquida AKTA Avant benchtop para este experimento.

Se ajustó el pH de carga de AEX al objetivo ± 0.05 unidades de pH usando 2M de base de tris o 2M de ácido acético. Se ajustó la conductividad de carga de AEX al objetivo ± 0.1 mS/cm usando 5M de cloruro de sodio o agua desionizada. Todas las muestras combinadas se analizaron por HMW, color y rendimiento.

Tabla 2-4. Sumario del Diseño de Estudio para el Estudio de Reducción de Color AEX

Separación de AEX	**Resina**	**Protocolo de AEX**
1	Capto Q	Tabla 2-6
2	POROS 50 HQ	Tabla 2-6
3	Q Sefarosa FF	Tabla 2-6

4	POROS 50 HQ	Tabla 2-5

Tabla 2-5. Protocolo de AEX de Flujo continuo, usado para el Estudio de Reducción de Color

Etapa	Descripción	Fase Móvil	Volúmenes de columna (CVs)	Velocidad Lineal (cm/h)
1	Pre-Equilibrio	2 M de cloruro de sodio (NaCl)	2	200
2	Equilibrio	50 mM Tris, 40 mM NaCl pH 7.90 – 8.10, 6.50 – 7.50 mS/cm	2	200
3	Carga	carga de AEX a pH 7.90 – 8.10, 6.50 – 7.50 mS/cm	30 g/L-resina	200
4	Lavado	50 mM Tris, 40 mM NaCl pH 7.90 – 8.10, 6.50 – 7.50 mS/cm	2	200
5	extracción 1	2 M de cloruro de sodio (NaCl)	2	200
6	extracción 2	1 N de hidróxido de sodio (NaOH)	2	200

AEX, cromatografía de intercambio aniónico; CV, volumen de columna

Tabla 2-6. Unir y eluir el Protocolo AEX usado para el Estudio de Reducción de Color

Etapa	Descripción	Fase Móvil	Volúmenes de columna (CVs)	Velocidad Lineal (cm/h)
1	Pre-Equilibrio	2 M de cloruro de sodio (NaCl)	2	200
2	Equilibrio	50 mM Tris pH 8.30 – 8.50, 1.90 – 2.10 mS/cm	2	200
3	carga	carga AEX a pH 8.30 – 8.50, 1.90 – 2.10 mS/cm	30 g/L-resina	200
4	lavado	50 mM Tris pH 8.30 – 8.50, 1.90 – 2.10 mS/cm	2	200

Etapa	Descripción	Fase Móvil	Volúmenes de columna (CVs)	Velocidad Lineal (cm/h)
5	Elución	50 mM Tris, 70 mM NaCl pH 8.30 – 8.50, 8.50 – 9.50 mS/cm	2	200
6	extracción 1	2 M de cloruro de sodio (NaCl)	2	200
7	extracción 2	1 N de hidróxido de sodio (NaOH)	2	200

AEX, cromatografía de intercambio aniónico; CV, volumen de columna

2.6 Resultados

Todas las cuatro separaciones AEX conducen a la reducción en color como se observa para coloración del flujo continuo y lavado para las separaciones 1-4 de AEX (**Tabla 2-7**). Mientras la primera de las tres separaciones de AEX se evaluó en un modo de unión y elución (**Tabla 2-6**), se observa que la mayoría del producto está presente en la carga y bloques de lavado (62%-94%).

La primera de las tres separaciones evalúa el pH 8.4 y 2.0 mS/cm del punto de ajuste para Capto Q, resinas POROS 50 HQ y FF de Sefarosa Q. Todas las tres separaciones tienen un buen rendimiento (>80%). La combinación AEX de POROS 50 HQ mostró el color amarillo inferior en la combinación AEX (valor b* de 2.09) seguido por la combinación AEX FF de Sefarosa Q (valor b* de 2.22) y la combinación AEX de Capto Q (valor b* de 2.55).

Tabla 2-7. Sumario de Resultados Experimentales del Estudio de Reducción de Color AEX

Separación de AEX	Fracción	Rendimiento (%)	HMW (%)	Color (L*)	Color (a*)	Color (b*)
1	FT/lavado	90.7	0.49	99.11	-0.27	2.55
2	FT/lavado	93.8	0.33	99.20	-0.28	2.09
3	FT/lavado	86.7	0.23	98.88	-0.23	2.22
4	FT/lavado	99.5	1.13	98.90	-0.39	3.40
-	combinación filtrada de MT1 (carga de AEX)	-	0.65	98.18	-0.37	4.17

AEX, cromatografía de intercambio aniónico; HMW, especies de peso molecular alto.

Las fracciones se ajustaron a una concentración de proteína de 5 g/L para mediciones de color.

2.7 Conclusiones

Como se observa para aflibercept (véase sección 2.3 anteriormente), se encontró el uso de AEX para reducir la coloración de amarillo-marrón (**Tabla 2-7**) para producción de MiniTrampa. Con referencia a la Tabla 2-7, la carga de AEX tiene un valor b* de 4.17, pero cuando se sometió a cromatografía de AEX (Separación 1-4 de AEX), el valor b* disminuyó indicando una disminución en coloración de amarillo-marrón. Nuevamente, como el valor b* disminuyó también lo hace la coloración. El valor de b* inicial de la carga AEX (a una concentración de 5 g/l) puede variar desde aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 25, más particularmente desde aproximadamente 1.0 hasta aproximadamente 20.0, y aún más particularmente desde aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 15.0. Después del uso de AEX, el valor b* del flujo continuo (a una concentración de 5 g/L) puede variar desde 0.5 hasta aproximadamente 10.0, más particularmente desde aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 7.0, y aún más particularmente desde aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 5.0.

Ejemplo 3. Estudio de Péptido Oxidado

3.1 Mapeos de Péptido

Preparación de Muestra. El mapeo tríptico de MiniTrampa alquilada y reducida (MT1) y MT4 (MiniTrampa similar a MT1 usando un aflibercept de longitud completa produce usando cultivo de célula de hidrolasa de soya) se realizaron las muestras para identificar y cuantificar modificación post-traduccional. Una alícuota de muestra se desnaturalizó usando 8.0 M de urea en 0.1 M de Tris-HCl, pH 7.5, reducido con DTT y después alquilado con yodoacetamida. La sustancia del fármaco desnaturalizado, reducido y alquilado primero se digirió con Lys-C recombinante (rLys-C) en una enzima para relación de sustrato de 1:1000 (p/p) a 37°C por 30 minutos, se diluyó con 0.1M de Tris-HCl, pH 7.5 tal que la concentración de urea final fue 1.8 M, subsecuentemente con tripsina a una enzima para relación de sustancia de 1:20 (p/p) a 37°C por 2 horas y después se glicolizó con F de PNGase a una relación de sustrato de enzima de 1:5 (p/p) por 37°C por 1 hora. La digestión se detuvo llevando el pH por debajo de 2.0 usando ácido fórmico (FA).

Análisis LC-MS. Se separó y analizó una alícuota de 20 µg de péptidos rLys-C/trípticos resultantes de cada muestra por cromatografía líquida de ultra-desempeño de fase inversa (UPLC) usando columna Waters ACQUITY UPLC CSH C18 (130 Å, 1.7 µm, 2.1×150 mm) seguido por detección PDA en línea (a longitudes de onda de 280 nm, 320 nm y 350 nm) y análisis de espectrometría de masa. Fase móvil A fue 0.1% de FA en agua y fase móvil B fue 0.1% de FA en acetonitrilo. Después

de la inyección de la muestra, un gradiente inició con 5 min de mantenimiento a 0.1% de B seguido por un incremento lineal a 35% de B sobre 75 minutos para operación óptima del péptido. Se condujeron experimentos MS y MS/MS en un espectrómetro de masa Thermo Scientific Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap con disociación colisional de alta energía (HCD) empleado para fragmentación de péptido para experimentos MS/MS. Las asignaciones de identidad de péptido se basan en la masa exacta experimentalmente determinada de un péptido dado en el espectro MS completo, así como también los iones del fragmento b e y en el espectro MS/MS de HCD correspondiente. Los cromatogramas de ion extraído de péptidos oxidados y péptido nativo correspondiente se generaron con las áreas de pico integrados para calcular el porcentaje de sitio específico de residuo(s) de aminoácido oxidado con la muestra MT1.

Fragmentos de Péptido Enlazados para Incrementar la Absorbancia a 350 nm

Se observaron los PTMs en MT1 en comparando los mapas de péptido tríptico para MT1 y MT4 (**FIGURA 12A** muestra la absorbancia de péptidos eluidos desde 20.0 a 75 minutos). Los péptidos con picos UV variados son destacados. La vista expandida del cromatograma se muestra en la FIGURA 12B la cual muestra la absorbancia de péptidos eluidos desde 16 a 30 minutos. Los péptidos con fuerte contraste en absorbancia UV entre MT1 y MT4 son TNYLTH*R (SEQ ID NO.: 21), IIW (+4)DSR (SEQ ID NO.: 28) y IIIW (+132)DSR (SEQ ID NO.: 124) (* o subrayados representan oxidación del residuo). Además, la vista expandida del cromatograma se muestra en la **Figura 12C**, la cual muestra la absorbancia de péptidos eluidos desde 30 a 75 minutos. Los péptidos con fuerte contraste en absorbancia UV entre MY1 y MT4 DKTH*TC*PPC*PAPELLG (SEQ ID NO.: 17), TELNVGIDFNWEYPSSKH*QHK (SEQ ID NO.: 20), EIGLLTCEATVNGH*LYK (SEQ ID NO.: 18) y QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19) (* representa oxidación del residuo). El mapeo de péptido reveló identidad de péptidos que son significativamente diferentes en abundancia entre las MiniTrampas de VEGF. La abundancia relativa de los péptidos identificados del análisis de mapeo de péptido se muestra en la **Tabla 3-1**. La cantidad de 2-oxo-histidina en MT1 (producido en un CDM) son mayores que MT4 (producido en hidrolasa de soya), sugiriendo que los medios usados para expresar aflibercept pueden tener un efecto significante en la abundancia relativa de péptidos con histidinas oxidadas o triptófanos oxidados. Por ejemplo, para el péptido QTNTIIDVVLSPSH*GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19), El porcentaje relativo a abundancia del péptido en MT1 (produce CDM) fue 0.015% comparado el porcentaje relativo a abundancia del péptido en MT4 (produce hidrolasa de soya; el cual es aproximadamente 15 veces menos comparado a MT1).

Tabla 3-1.

Péptido	Secuencia Modificada del Péptido	MT1	MT4	veces de cambio MT1/MT4
EIGLLTCEATVNGHLYK (SEQ ID NO.: 57)	EIGLLTC[+57]EATVNGH[+14]LYK (SEQ ID NO.: 18)	0.011%	0.004%	2.75
QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK (SEQ ID NO.: 58)	QTNTIIDVVLSPSH[+14]GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)	0.015%	0.001%	15.00
TELNVGIDFNWEYPSSKHQHK (SEQ ID NO.: 59)	TELNVGIDFNWEYPSSKH[+14]QHK (SEQ ID NO.: 20)	0.204%	0.026%	7.85
DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO.: 60)	DKTH[+14]TC[+57]PPC[+57]PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)	0.115%	0.018%	6.39
TNYLTHR (SEQ ID NO.: 61)	TNYLTH[+14]R (SEQ ID NO.: 21)	0.130%	0.020%	6.50

Color y Cuantificación de 2-oxo-Histidina. El porcentaje de 2-oxo-histidinas en los oligopéptidos que se generaron por digestión de proteasa, como se midió por espectrometría de masa, también se muestra (**Tabla 3-2**). (Los valores se normalizaron contra péptidos no modificados.) **Tabla 3-2 (I)** muestra el porcentaje de histidina/triptófanos oxidados observados por flujo continuo de AEX: MT1 lote 1, flujo continuo de AEX MT1 lote 2, y flujo continuo de AEX MT1 lote 3. **Tabla 3-2 (II)** muestra el porcentaje de histidina/triptófanos oxidados observados para fracción 1 acídico, fracción 2 acídico, y fracciones principales obtenidos realizando separación de CEX por MT1 lote 3. De esta Tabla, es claro que las variantes acídicas son comprendidas de especies oxidadas. De la Tabla 3-2(I), es claro que el % de dioxidación de 2-oxo-histidinas y triptófano que comprenden péptidos/proteína se reduce en el flujo continuo de AEX comparado a la extracción de AEX. Es evidente que la extrayendo la columna de AEX enriquece el porcentaje de tales péptidos modificados. Por ejemplo, el % del péptido modificado “EIGLLTC[+57]EATVNGH[+14]LYK (SEQ ID NO.: 18)” en el flujo continuo de AEX (MT1 lote 1) fue 0.013% y en la "extracción de AEX" fue 0.080%. Esto también corrobora que la columna de AEX captura péptidos modificados, así reduce el porcentaje de péptidos modificados en el flujo continuo de AEX.

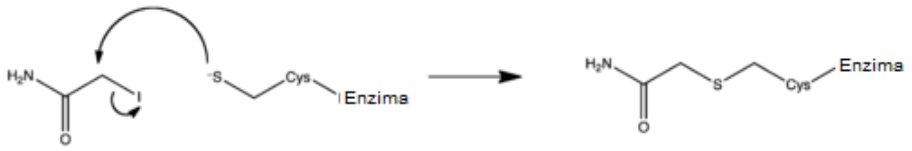
Tabla 3-2 (I). Porcentaje de 2-oxo-Histidinas/Triptofanos

Péptidos Modificados	extracción de AEX	Flujo continuo de AEX		
	amarillo intenso	MT1 lote 1 BY1, 110 mg/mL	MT1 lote 2 ≤BY3, 110 mg/mL	MT1 lote 3 ≤BY3, 110 mg/mL
EIGLLTC[+57]EATVNGH[+14]LYK (SEQ ID NO.: 18)	0.080%	0.013%	0.008%	0.006%
QTNTIIDVVLSPSH[+14]GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)	0.054%	0.028%	0.023%	0.019%
TELNVGIDFNWEYPSSKH[+14]QHK (SEQ ID NO.: 20)	0.235%	0.085%	0.049%	0.049%
DKTH[+14]TC[+57]PPC[+57]PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)	0.544%	0.092%	0.077%	0.057%
TNYLTH[+14]R (SEQ ID NO.: 21)	0.089%	0.022%	0.011%	0.010%
IIW[+32]DSR (SEQ ID NO.: 28)	0.738%	0.252%	0.198%	0.298%

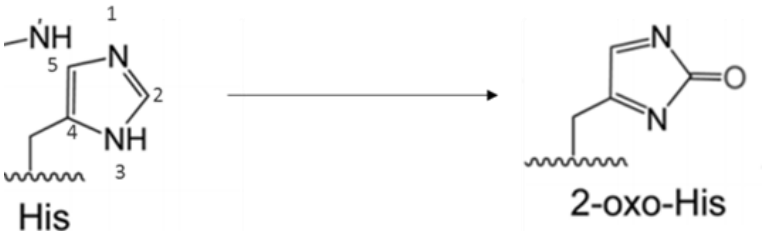
Tabla 3-2 (II). Porcentaje de 2-oxo-Histidinas/Triptofanos

Péptidos Modificados	flujo continuo de CEX		
	fracción 1 acídica de MT1 lote 3 amarillo	fracción 2 acídico de MT1 lote 3 amarillo	fracción principal de MT1 lote 3 sin color
EIGLLTC[+57]EATVNGH[+14]LYK (SEQ ID NO.: 18)	0.009%	0.008%	0.004%
QTNTIIDVVLSPSH[+14]GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)	0.013%	0.015%	0.006%
TELNVGIDFNWEYPSSKH[+14]QHK (SEQ ID NO.: 20)	0.131%	0.151%	0.049%
DKTH[+14]TC[+57]PPC[+57]PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)	0.117%	0.132%	0.068%
TNYLTH[+14]R (SEQ ID NO.: 21)	0.014%	0.008%	0.008%
IIW[+32]DSR (SEQ ID NO.: 28)	0.458%	0.269%	0.185%

En la **Tabla 3-2(II)**, [+57] representa alquilación de cisteína por yodoactamida se agregó una porción de carboximetil amina en la cisteína, el cual es un incremento de masa neta de aproximadamente +57 sobre cisteína no modificada:



En la Tabla **3-2(II)**, [+14] representa la conversión de His a 2-oxo-His, se agregó un átomo de oxígeno en carbono 2, pero dos átomos de hidrógeno están perdidos (uno de carbono 2, el otro de nitrógeno 3), lo cual es un incremento de masa neto de aproximadamente +14 sobre histidina no modificada.



En la **Tabla 3-2(II)**, [+32] representa dioxidación de triptofano resultando en la formación de N-formilcinurenina lo cual es un incremento en masa neta de aproximadamente +32 sobre triptófano no modificado (**FIGURA 4**).

Se realizó un segundo juego de experimentos para evaluar el porcentaje de 2-oxo-histidinas (y dioxidación de triptófano) en oligopéptidos de aflibercept escindido por FabRICATOR digerido por proteasa (MT4) lo cual se procesó por cromatografía de AEX (**Figura 13** y **Tabla 3-3** a continuación). El porcentaje de 2-oxo-histidinas y dioxidación de triptófano en extracción de AEX por oligopéptidos de aflibercept escindido por FabRICATOR digerido por proteasa (MT4) fue significativamente más que el porcentaje de 2-oxo-histidinas y dioxidación de triptófano en el flujo continuo de AEX (referido a "MT1" en la **Tabla 3-3** a continuación).

Tabla 3-3. Porcentaje de 2-oxo-Histidinas

Péptidos Modificados	Aflibercept de longitud completa	MT1	extracción de AEX de MT1	veces de cambio de extracción de AEX veces/MT1
IIW[+32]DSR (SEQ ID NO.: 28)	0.22%	0.34%	0.81%	2.4
EIGLLTC[+57]EATVNGH[+14]LYK (SEQ ID NO.: 18)	0.00%	0.02%	0.08%	4.0
QTNTIIDVVLSPSH[+14]GIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)	0.01%	0.04%	0.07%	1.8
TELNVGIDFNWEYPSSKH[+14]QHK (SEQ ID NO.: 20)	0.01%	0.19%	0.42%	2.2
DKTH[+14]TC[+57]PPC[+57]PAPELLG (SEQ ID NO.: 17)	0.01%[a]	0.11%	0.63%	5.7
TNYLTH[+14]R (SEQ ID NO.: 21)	0.00%	0.03%	0.10%	3.3

[a] El valor calculado usando un péptido diferente para aflibercept de longitud completo, como el péptido C-terminal es diferente de MiniTrampa.

El porcentaje de 2-oxo-histidina y dioxidación de triptófano en extracción de AEX fue significantemente más que el porcentaje de 2-oxo-histidinas y dioxidación de triptófano en el flujo continuo de AEX durante las producciones de MT1 (referido a "MT1" en la **Tabla 3-3** a continuación). Comparado a la **Tabla 3-2**, **Tabla 3-3** muestra resultados similares que extraer la columna de AEX produce una muestra con un porcentaje significativamente mayor de 2-oxo-histidinas y dioxidación de triptófano comparado al porcentaje de 2-oxo-histidina y dioxidación de triptófano en flujo continuo de AEX que sugiere que el 2-oxo-histidina y especies de dioxidación de triptófano se unen a la columna AEX durante la separación y se remueven hasta extracción de la columna AEX. Esto es además evidente en el cromatograma de ion extraído como se observa en la **FIGURA 14**.

Cromatograma de Intercambio Catiónico Fuerte (CEX)

Se condujeron una serie de experimentos para identificar especies acídicas y otras variantes presentes en las muestras que comprenden proteínas anti-VEGF.

Se realizó la cromatografía de intercambio catiónico fuerte usando una columna GL MonoS (10/100) (GE Life Sciences, Marlborough, MA). Para las separaciones de muestra, las fases

móviles usadas son 20 mM de ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico (MES), pH 5.7 (Fase Móvil A) y 40 mM de fosfato de sodio, 100 mM de cloruro de sodio pH 9.0 (Fase Móvil B). Se usó un gradiente de pH no lineal para eluir variantes de carga de MT1 con detección a 280 nm. Los picos que eluyen a un tiempo de residencia relativo primero que el pico principal se designa en la presente como especies acídicas.

Una muestra del MT1 lote 2 (≤ BY3), ante cualquier enriquecimiento, se sometió a CEX usando el método como se describe en la FIGURA 15. La destilación se aplicó a la muestra para reducir la complejidad de variantes de MT1. Esto se siguió por procesamiento SEC preparativo (Superdex 200 prep grado XK26/100) usando DPBS 1X, pH 7.2 ± 0.2, como la fase móvil. Las fracciones obtenidas de la columna SEC preparativa que comprende MiniTrampa desialiada (dsMT1) se combinaron y se sometieron adicionalmente a cromatografía de intercambio catiónico fuerte (SCX) para enriquecer variantes de carga de MT1 usando un gradiente de pH salino dual. El procedimiento resultó en un total de 7 fracciones (F1-F7; MC representa el método de control, **FIGURA 16** y **FIGURA 17**).

En la realización de CEX, las especies acídicas eluidas primero que los picos principales y especies básicas eluidas después de los picos principales. Como se observa en la **FIGURA 17**, los picos 3-5 son los picos principales. Los picos 1 y 2 son eluidos antes de la elución de las especies principales de MT1 (picos 3-5), y así, comprende las especies acídicas. El pico 6 es eluido después de la elución de las especies principales de MT1 (picos 3-5), y así, comprende las especies básicas. La Tabla 3-4 muestra la abundancia relativa de los picos en MC (como se identificó en la **FIGURA 16**). Por ejemplo, dos filas de la Tabla 3-4 (MC etiquetado) muestra que la cantidad relativa total de especies acídicas en MC es aproximadamente 19.8% (es decir, pico 1 + pico 2). Tabla 3-4 también muestra la abundancia relativa de los picos para cada fracción individual. Mientras son especies traslapantes en las diferentes fracciones (como se refleja en la **FIGURA 16** y **FIGURA 17**), la mayoría de las fracciones F1 y F2 son especies acídicas (es decir, pico 1 y pico 2). Por ejemplo, la fracción F1 es comprendida de 63.7% de pico 1 y 19.2% de pico 2 (para un total de 82.9% de especies acídicas). La fracción F2 es comprendida de 9.6% del pico 1 y 75.9% del pico 2 (para un total de 85.5 % de especies acídicas). La mayoría de las fracciones F3-F5 son las especies principales de MT1 (picos 3-5). Por último, la mayoría de las fracciones F6-F7 son las especies básicas (pico 6) pero incluyen algunas porciones de las especies principales (por ejemplo, picos 4 y 5).

También se observó que las fracciones F1 y F2 (las cuales comprenden las especies acídicas) tienen una coloración amarillo-marrón intensa comparado a las fracciones F3-F5 (lo cual comprende las especies principales o "MT1"). Todas las fracciones se inspeccionaron para color

a concentraciones de ≥13 mg/ml. Como es evidente a partir de este Ejemplo, la presencia de especies acídicas en la muestra rastreada con la apariencia de coloración amarillo-marrón, remoción (o minimización) de lo cual se puede lograr removiendo (o minimizando) las especies acídicas de MT1.

Tabla 3-4. Abundancia relativa de picos con base de CEX analítico

Muestra	Área de Pico (%)					
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6
MC	5.9	13.9	15.0	25.4	20.9	19.0
MT1 F1	63.7	19.2	17.1	ND	ND	ND
MT1 F2	9.6	75.9	10.6	2.2	1.6	ND
MT1 F3	ND	5.0	57.2	37.8	ND	ND
MT1 F4	ND	ND	16.3	56.3	27.4	ND
MT1 F5	ND	ND	ND	33.1	50.4	16.5
MT1 F6	ND	ND	ND	16.0	27.7	56.3
MT1 F7	2.8	7.7	8.0	16.1	16.5	48.9

ND: No Detectado

Se mostraron los cromatogramas 3D para MT1 lote 2 y fracciones F1-F7 en las **Figuras 18A-H**. El MT1 lote 2 no exhibe cualquiera de las características espectrales significantes (**FIGURA 18A**). Las fracciones 1 y 2 (que comprende las especies acídicas) exhiben una asignación espectral entre 320-360 mm (véase el círculo en la **FIGURA 18B**). Esta característica fue más prominente en fracción 1 comparado a la fracción 2 (**Figuras 18B y 18C**) y fue ausente en fracción 3 y fracciones 4-7 (especies principales, MT1)(**Figuras 18D** y **18H**), las cuales no exhiben coloración amarillo-marrón.

Así, como se observó anteriormente, CEX condujo para la identificación de especies acídicas/fracciones acídicas (fracciones 1 y 2) las cuales se muestran en coloración amarillo-marrón comparado a las especies principales/fracciones (fracciones 3-6). Este resultado también se observó en la forma de una asignación espectral distinta presente en los cromatogramas 3D de fracciones F1-F2 y ausente en las fracciones F3-F7.

Electroferogramas de Imagen capilar de Enfoque isoeléctrico (icIEF)

Además, se valoró la distribución de variantes en fracciones F1-F7 y MC (de MT1-lote 2 después de CEX) por icIEF (**FIGURA 19**).

Se valoró adicionalmente la distribución de variantes en fracciones F1-F7 y MC (de MT1 - lote 2

después CEX) por icIEF usando un analizador iCE3 (ProteinSimple) con cartucho capilar recubierto con fluorocarbono (100 µm x 5 cm). La solución de anfolita consiste en una mezcla de 0.35% de metilcelulosa (MC), 0.75% de anfolitos portadores de Pharmalyte 3-10, 4.2% de anfolito portador de Pharmalyte 8-10.5, y 0.2% de marcador pI 7.40 y 0.15% de marcador pI 9.77 en agua purificada. El anolito fue 80 mM de ácido fosfórico, y el catolito fue 100 mM de hidróxido de sodio, ambos en 0.10% de metilcelulosa. Las muestras se diluyeron en agua purificada y se agregó sialidasa A a cada muestra diluida en una enzima a relación de sustrato de 1:200 (unidades de sialidasa A por miligramo de MT1) seguido por incubación a temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas. Las muestras tratadas con sialidasa A se mezclaron con la solución de anfolito y después se enfocó introduciendo un potencial de 1500 V por un minuto seguido por un potencial de 3000 V por 7 minutos. Se obtuvo una imagen de variantes MT1 enfocado haciendo pasar 280 nm de luz ultravioleta a través de la capilaridad en las lentes de una cámara digital de dispositivo acoplado cargado. Esta imagen después se analizó para determinar la distribución de variantes de carga variadas. (**FIGURA 19**). Con referencia a la FIG. 19, las fracciones F1 y F2 (o las fracciones acídicas) mostró una ausencia del pico para MT1, lo cual es claramente observado para MC y fracciones F3-F7 (especies principales, MT1). Sí, los electroferogramas icIEF se consideraron capaces para detectar y determinar la distribución de las variantes de carga diferentes de la proteína bajo consideración. MT1 en este caso. Así, es evidente que las fracciones acídicas realizando el análisis de CEX mostró (a) abundancia relativa incrementada de porcentaje de 2-oxo-histidina o dioxo-triptofano (**Tabla 3-2 (II**); (b) coloración amarillo-marrón incrementada (datos no mostrados); y (c) presencia de una asignación espectral como se observa en los cromatogramas 3D para fracciones 1 y 2 (**FIGURA 18B** y **FIGURA 18C**).

Ejemplo 4. Estudio de Foto-Inducción

En este ejemplo, la foto-inducción de MiniTrampa de VEGF (MT), por ejemplo, MT1, se realizó exponiendo una muestra de proteína a cantidades variadas de luz fluorescente blanca fría (CW) o luz ultravioleta (UVA). Se determinó el color y contenido de aminoácido oxidado de las muestras expuestas a la luz. El análisis LCMS se realizó siguiendo la exposición, como se explica anteriormente. La exposición de MT a luz blanca fría o luz UVA produce un incremento en residuos de aminoácido oxidado, por ejemplo, histidina (**Tabla 4-1**, **Tabla 4-2** y **Tabla 4-3**).

Tabla 4-1. Diseño de Estudio de Foto-Inducción

exposición acumulativa	**0.2 (xICH)**	**0.5 (xICH)**	**0.8 (xICH)**	**1.0 (xICH)H**	**2.0 (xICH)**
exposición fluorescente de	0.24 millones	0.6 millones lux*hr	0.96 millones	1.2 millones lux*hr	2.4 millones lux*hr

CW (lux*hr)	lux*hr		lux*hr		
tiempo de incubación con luz fluorescente CW (a 8 klux)	30 horas	75 horas	100 horas	150 horas	300 horas
exposición a UVA (W*hr/m^2)	40	100	160	200	400
tiempo de incubación con UVA (a 10 W/m^2)	4 horas	10 horas	16 horas	20 horas	40 horas

ICH se refiere a ICH Guía tripartita armonizada: Prueba de Estabilidad: Prueba de fotoestabilidad de Sustancias y Productos de Fármaco Nuevo Q1B lo cual específica estudios de fotoestabilidad para ser conducidos con no menos que 1-2 millones de lux*horas de luz fluorescente blanca fría y cera de energía ultravioleta de no menos que 200 W*hr/m^2.

La **Tabla 4-2** describe el incremento en coloración de la muestra de MT expuesta a luz blanca fría y luz ultravioleta. Por ejemplo, el valor b para la muestra (t=0) fue 9.58. Al exponer esta muestra a luz blanca fría a 2.4 millones lux*hr. El valor b incrementa a 22.114. Esto incremento en valor b indica que la exposición de MT a luz blanca fría a 2.4 millones lux*hr incrementa la coloración amarilla-marrón de la muestra comparado a la muestra (t=0). De manera similar, al exponer la muestra MT (t=0) a luz ultravioleta a 400 W*h/m^2, el valor b se incrementa a 10.72 de 9.58. Este incremento en el valor b indica que la exposición de muestra MT a luz ultravioleta a 400 W*h/m2 produce un incremento en coloración amarillo-marrón de la muestra comparada a la muestra (t=0).

Tabla 4-2. Color de Muestras Expuestas a Luz Blanca Fría y Luz Ultravioleta

Foto exposición de xICH (lux*hr)	**L***	**a***	**b***	**Valor BY**
Luz Blanca Fría				
T=0	97.37	-1.12	9.58	4.0
0.2x (0.24 millones lux*hr)	96.46	-0.72	11.75	3.7

Foto exposición de xICH (lux*hr)	L*	a*	b*	Valor BY
Luz Blanca Fría				
0.5x (0.6 millones lux*hr)	95.47	-0.4	11.3	3.7
0.8x (0.96 millones lux*hr)	95.33	-0.38	11.96	3.6
1.0x (1.2 millones lux*hr)	94.42	-0.2	13.72	3.3
2.0x (2.4 millones lux*hr)	92.70	0.41	22.14	2.0
UVA				
0.2x (40 W*h/m^2)	97.26	-0.92	12.66	3.5
0.5x (100 W*h/m^2)	100.39	-1.01	11.83	3.7
0.8x (160 W*h/m^2)	79.69	-0.18	10.1	3.6
1.0x (200 W*h/m^2)	97.48	-0.95	11.36	3.7
2.0x (400 W*h/m^2)	97.76	-0.98	10.72	3.8

La muestra de colores son indicativo de usar el espacio de color CIELAB (variables L*,a* y b*) y relativo al estándar de color EP BY; L* = blanco a negro (L* es luminosidad); a* = magenta a agua; b* = amarillo a azul, el mayor valor b es más amarillo.

Tabla 4-3 (I). Niveles de 2-oxo-His en Péptidos de MiniTrampa de Luz ultravioleta estresada

Péptidos	Sitio	t0	UV_4h	UV_10h	UV_16h	UV_20h	UV_40h
DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO.: 17)	H209	0.056 %	0.067 %	0.081 %	0.088 %	0.077%	0.091%
EIGLLTCEATVNGHLYK (SEQ ID NO.: 18)	H86	0.010 %	0.020 %	0.034 %	0.037 %	0.033%	0.035%
QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)	H110	0.024 %	0.031 %	0.028 %	0.028 %	0.027%	0.027%

Péptidos	Sitio	t0	UV_4h	UV_10h	UV_16h	UV_20h	UV_40h
TELNVGIDFNWEYPSSKHQHK (SEQ ID NO.: 20)	H145	0.096%	0.147%	0.163%	0.173%	0.147%	0.125%
TNYLTHR (SEQ ID NO.: 21)	H95	0.014%	0.032%	0.044%	0.056%	0.058%	0.078%
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 22)	H19	0.007%	0.013%	0.021%	0.025%	0.024%	0.034%
VHEKDK (SEQ ID NO.: 23)	H203	0.040%	0.105%	0.238%	0.255%	0.269%	0.324%

Tabla 4-3 (II). Niveles de 2-oxo-His en Péptidos de MiniTrampa de Luz ultravioleta estresada

Péptidos	Sitio	t0	CW_30h	CW_75h	CW_100h	CW_150h	CW_300h
DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO.: 17)	H209	0.056%	0.152%	0.220%	0.243%	0.258%	0.399%
EIGLLTCEATVNGHLYK (SEQ ID NO.: 18)	H86	0.010%	0.063%	0.110%	0.132%	0.170%	0.308%
QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19)	H110	0.024%	0.085%	0.120%	0.128%	0.148%	0.180%
TELNVGIDFNWEYPSSKHQHK (SEQ ID NO.: 20)	H145	0.096%	0.423%	0.585%	0.634%	0.697%	0.748%
TNYLTHR (SEQ ID NO.: 21)	H95	0.014%	0.103%	0.175%	0.198%	0.267%	0.437%
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 22)	H19	0.007%	0.025%	0.043%	0.049%	0.058%	0.115%
VHEKDK (SEQ ID NO.: 23)	H203	0.040%	0.426%	0.542%	0.622%	0.702%	1.309%

La exposición de aflibercept MT a luz blanca fría o luz UVA rastreada con la apariencia de histidinas (2-oxo-his) oxidada (Tabla 4-3). Con referencia a la Tabla 4-3, el péptido “SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 22)” con oxo-histidina fue 0.007% en muestra MT

(t=0), mientras su abundancia se incrementa a 0.324% en exposición a luz ultravioleta por 40 horas (**Tabla 4-3**(I) y a 1.39% en exposición para luz blanca fría por 300 horas (**Tabla 4-3**(II)).

Se observaron dos especies de 2-oxo-histidina, unas especies 13.98 Da (como se muestra en la **FIGURA 2**) y unas especies 15.99 Da (como se muestra en la **FIGURA 3**), con las especies 13.98 Da son predominante en muestras de MiniTrampa estresada ligera. Las especies 15.99 Da se conoce por ser un producto de un proceso catalizado de metal de cobre (Schöneich J. Pharm Biomed Anal. 21:1093-1097 (2000)). Sin embargo, las especies 13.98 Da es un producto de un proceso de conducción ligero (Liu et al., anal. Chem., 86, 10:4940-4948 (2014)).

Similar a la abundancia incrementada de histidinas oxidadas en muestras expuestas a luz blanca fría y luz UVA, la exposición de MT a luz blanca fría o luz UVA también induce la formación de otros PTMs (**Tabla 4-4** y **Tabla 4-5**).

Tabla 4-4 (I). Otros PTMs en Péptidos de MiniTrampa de Luz ultravioleta estresada

Péptidos	**Sitio**	**t0**	**UV_4h**	**UV_10h**	**UV_16h**	**UV_20h**	**UV_40h**
Desaminación							
EIGLLT**C**EATV**N**GHLYK (SEQ ID NO.: 62)	N84	20.8%	21.7%	21.5%	21.5%	22.7%	22.4%
QT**N**TIIDVVLSPSHGIELSVGEK (SEQ ID NO.: 63)	N99	5.3%	5.4%	5.5%	5.4%	5.5%	5.6%
Oxidación							
SDTGRPFVE**M**YSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 64)	M10	4.5%	8.2%	11.1%	13.3%	13.8%	19.3%
SDTGRPFVEMYSEIPEIIH**M**TEGR (SEQ ID NO.: 65)	M20	1.1%	2.0%	2.8%	3.4%	3.4%	4.6%
TQSGSE**M**K (SEQ ID NO.: 66)	M163	2.0%	2.7%	4.1%	4.6%	7.9%	8.7%
SDQGLYT**C**AASSGL**M**TK (SEQ ID NO.: 67)	M192	5.4%	8.1%	10.9%	12.1%	12.5%	18.3%
3-desoxiglucanasona							
SDTG**R**PFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 68)	R5	9.9%	10.0%	9.9%	9.7%	9.8%	9.3%

Tabla 4-4 (II). Otros PTMs en Péptidos de MiniTrampa de Luz ultravioleta estresada

Péptidos	Sitio	t0	CW_30 h	CW_75 h	CW_100 h	CW_150 h	CW_300h
Desaminación							
EIGLLT**C**EATV**N**GHLYK (SEQ ID NO.: 62)	N84	20.8 %	22.0%	22.9%	20.3%	21.8%	21.3 %
QT**N**TIIDVVLSPSHGIELSVGEK (SEQ ID NO.: 63)	N99	5.3%	5.6%	5.2%	5.6%	5.5%	5.8 %
Oxidación							
SDTGRPFVE**M**YSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 64)	M10	4.5%	11.7%	17.3%	19.9%	25.1%	39.7 %
SDTGRPFVEMYSEIPEIIH**M**TEGR (SEQ ID NO.: 65)	M20	1.1%	3.1%	4.3%	5.1%	6.1%	8.2 %
TQSGSE**M**K (SEQ ID NO.: 66)	M163	2.0%	3.3%	15.7%	11.7%	26.4%	20.5 %
SDQGLYT**C**AASSGL**M**TK (SEQ ID NO.: 67)	M192	5.4%	10.7%	15.3%	18.7%	22.8%	37.6 %
3-desoxiglucanasona							
SDTG**R**PFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 68)	R5	9.9%	9.9%	9.6%	9.3%	9.3%	9.0 %

Tabla 4-5 (I). Niveles de oxidación de Triptofano/Tirosina/Fenilalanina en Péptidos de MiniTrampa de Luz ultravioleta estresada

Péptidos	Modificación	Sitio	t0	UV_4 h	UV_10 h	UV_16 h	UV_20h	UV_40h
SDQGLYT**C**AASSGL**M**TK (SEQ ID NO.: 67)	+4	W58	0.016 %	0.049 %	0.089 %	0.119 %	0.132%	0.221%
	+16		0.047 %	0.109 %	0.177 %	0.225 %	0.242%	0.514%
	+32		0.200 %	0.487 %	0.415 %	0.481 %	0.423%	0.498%
	+48		0.000	0.000	0.000	0.001	0.001%	0.001%

			%	%	%	%		
TELNVGIDFN**W**EYPSSK (SEQ ID NO.: 29)	+4	W138	0.435%	0.462%	0.550%	0.557%	0.502%	0.512%
	+16		0.083%	0.100%	0.161%	0.206%	0.239%	0.448%
	+32		0.009%	0.018%	0.027%	0.039%	0.044%	0.115%
	+48		0.284%	0.278%	0.270%	0.302%	0.343%	0.275%
GFIISNAT**Y**K (SEQ ID NO.: 69)	+16	Y64	0.032%	0.041%	0.046%	0.053%	0.054%	0.073%
K**F**PLDTLIPDGK (SEQ ID NO.: 70)	+16	F44	0.068%	0.077%	0.087%	0.084%	0.070%	0.096%
FLSTLTIDGVTR (SEQ ID NO.: 71)	+16	F166	0.066%	0.075%	0.085%	0.089%	0.089%	0.124%

Tabla 4-5 (II). Niveles de oxidación de Triptofano/Tirosina/Fenilalanina en Péptidos de MiniTrampa de Luz ultravioleta estresada

Péptidos	**Modificación**	**Sitio**	**t0**	**CW_30h**	**CW_75h**	**CW_100h**	**CW_150h**	**CW_300h**
SDQGLYT**C**AASSGL**M**TK (SEQ ID NO.: 67)	+4	W58	0.016%	0.063%	0.124%	0.161%	0.228%	0.526%
	+16		0.047%	0.129%	0.227%	0.283%	0.377%	0.795%
	+32		0.200%	1.601%	2.706%	3.139%	3.925%	6.974%
	+48		0.000%	0.001%	0.002%	0.002%	0.003%	0.005%
TELNVGIDFN**W**EYPSSK (SEQ ID NO.: 29)	+4	W138	0.435%	0.555%	0.481%	0.490%	0.429%	0.522%
	+16		0.083%	0.109%	0.364%	0.251%	0.399%	0.753%
	+32		0.009%	0.019%	0.027%	0.033%	0.048%	0.135%
	+48		0.284%	0.284%	0.330%	0.308%	0.347%	0.316%
GFIISNAT**Y**K (SEQ ID NO.: 69)	+16	Y64	0.032%	0.043%	0.057%	0.063%	0.078%	0.127%
K**F**PLDTLIPDGK	+16	F44	0.068%	0.087%	0.072%	0.088%	0.079%	0.144%

Péptidos	**Modificación**	**Sitio**	**t0**	**CW_30h**	**CW_75h**	**CW_100h**	**CW_150h**	**CW_300h**
(SEQ ID NO.: 70)								
FLSTLTIDGVTR (SEQ ID NO.: 71)	+16	F166	0.066%	0.091%	0.088%	0.101%	0.112%	0.168%

De este modo, La exposición de MT a luz blanca fría o luz UVA rastreada con la apariencia de residuos oxidados (tal como histidinas/triptófanos (oxo-Trp)). Cuatro especies de oxo-trp se observaron: +4 Da, +16 Da, +32 Da y +48 Da. Las especies +4 se explican por la formación de cinurenina (**FIGURA 4**), mientras la +16 Da, +32Da y +48 Da son de mono-oxidación, di-oxidación y tri-oxidación de residuos de triptófano. El mapeo de péptido de tríptico digerido de muestras MT monitoreadas a 320 nm como se muestra en la **FIGURA 20**. La presencia relativa de residuos oxidados que comprenden péptidos se puede comparar en la **FIGURA 20**. Por ejemplo, para el péptido, IIW (+4)DSRK (SEQ ID NO.: 114), una diferencia significante en su presencia se puede observar por la muestra MT a t=0, y muestra MT1 expuesta a UVA por 40 horas y muestra MT expuesta a CWL por 300 horas.

La exposición de MT a luz blanca fría o luz UVA también se evaluó por la presencia de especies HMW/peso molecular bajo (LMW) (**Tabla 4-6**).

Tabla 4-6. Se generaron especies HMW/LMW después de estrés UVA y CWL extendida

Muestra: MT1, 80mg/mL, pH 5.8						
	Muestras expuestas a luz	muestras de control oscuras	Muestras expuestas a luz	muestras de control oscuras	Muestras expuestas a luz	muestras de control oscuras
exposición a UVA acumulativa (x ICH)						
	% HMW		% Nativo		% LMW	
t=0	2.1	NA	96.7	NA	1.2	NA
0.2x ICH (40 W*h/m2)	2.1	2.1	96.7	96.7	1.2	1.3
0.5x ICH (100 W*h/m2)	11.6	2.2	86.5	96.6	1.9	1.2
0.8x ICH (160 W*h/m2)	14.5	2.2	83.4	96.6	2.1	1.2
1.0x ICH (200 W*h/m2)	15.8	2.2	81.9	96.6	2.3	1.3

2.0x ICH (400 W*h/m2)	22.7	2.3	74.5	96.7	2.8	1.0
exposición a CWL acumulativa (x ICH)						
	% HMW		% Nativo		% LMW	
0.2x ICH (0.24 millón lux* h)	12.1	2.2	86.6	96.6	1.4	1.2
0.5x ICH (0.6 millón lux*hr)	20.4	2.3	77.9	96.4	1.6	1.3
0.8x ICH (0.96millones lux*hr)	23.2	2.4	75.1	96.2	1.7	1.4
1.0x ICH (1.2 millones lux*hr)	30.1	2.6	68.1	96.2	1.9	1.3
2.0x ICH (2.4 millones lux*hr)	45.0	2.9	52.6	95.8	2.4	1.4

Para rastrear la coloración con respecto a especies HMW/LMW para cada muestra, se realizó cromatografía de exclusión de tamaño analítica con detección de PDA de espectro completo (SEC-PDA) como se muestra anteriormente en todas las muestras estresadas (CWL y UVA). El análisis SEC-PDA de MT estresado con CWL reveló incremento significante en absorbancia a ~350 nm para variantes de todos los tamaños excepto las especies LMW (**FIGURA 21**). Mientras la SEC-PDA en MT estresado con UVA no reveló incremento en absorbancia a ~350 nm (**FIGURA 22**). A diferencia de las muestras estresadas tratadas con CWL, las muestras estresadas tratadas con UVA no producen cualquier color amarillo-marrón significantemente cuantificable.

Se obtiene un resultado similar después de estudiar las relaciones de absorbancia a 320 nm y 280 nm por las muestras estresadas por UVA y CWL. Las relaciones A320/A280, analizadas ya sea por intensidad bruta o área de pico total, rastreada con intensidad incrementada de color amarillo en muestras estresadas por CWL (**Figura 23**), mientras que las relaciones A320/A280 no rastrean con intensidad incrementada de color amarillo en muestras estresadas con UVA (FIGURA 24). Esto corrobora la observación previa que las muestras MT1 se someten a estrés con UVA no resulta en el mismo color amarillo-marrón observado después del estrés con CWL.

Ejemplo 5. Métodos con dirección ascendente para Reducir la coloración

5.1 Estudio de Incubación de Medio químicamente definido

Se examinó el efecto de varios constituyentes clavados en el medio químicamente definido fresco (CDM) que comprende aflibercept con respecto a coloración.

Uno o más tubos agitadores con tapón de ventilación de 50 ml con 10 ml de volumen de trabajo (CDM1 fresco) se incubaron por 7 días, tomando muestras en el día 0 y día 7. Las muestras de aflibercept (proteína recombinante de aflibercept en una solución amortiguada acuosa, pH 6.2, que comprende 5 mM de fosfato de sodio, 5 mM de citrato de sodio y 100 mM de cloruro de sodio) se clavaron en tubos agitadores a una concentración de 6 g/L.

Componentes agregados para alcanzar una concentración acumulativa:

- Cisteína: 16.6 mM
- Hierro: 0.23 mM
- Cobre: 0.0071 mM
- Zinc: 0.54 mM

El efecto escalado de cada constituyente agregado en el valor b* (espacio de color CIE L*, a*, b*) se muestra en la **FIGURA 25A** y gráfica del actual valor b* contra el valor b* pronosticado se muestra en la **FIGURA 25B**. Además, a la cisteína resultada en el incremento de color amarillo-marrón más grande. El hierro y zinc también generaron color. El grupo de ácido fólico y vitamina B (que incluye tiamina, niacinamida, ácido D-pantoténico, D-biotina y piridoxina) incrementa el color amarillo-marrón. La riboflavina y vitamina B12 no impactan estadísticamente el color.

5.2 Efecto de Disminución de Cisteína y Metales en valor b*

Se inocularon los biorreactores (por ejemplo, 2L) de un cultivo sembrado de una línea de célula que produce aflibercept. Los cultivos inoculados se hicieron crecer a una temperatura de 35.5°C, pH de 7.1 ± 0.25, y punto de ajuste de burbujeo de aire de 22 ccm. La glucosa, antiespuma y alimentos basales se suplementaron a los biorreactores como se necesiten. Se evalúa el efecto de disminuir la concentración de cisteína y de metales en color cuando se expresa aflibercept en CDM1.

Medio en el día 0 = CDM1, que incluye 1.48 mM de cisteína

- Nutrientes alimentados:
  - Día 2 = alimento químicamente definido (CDF) + 1.3-2.1 mM cisteína
  - Día 4 = CDF + 1.6-1.7 mM cisteína
  - Día 6 = CDF + 1.6-1.7 mM cisteína
  - Día 8 = CDF + 1.6-1.7 mM cisteína

Las condiciones del biorreactor son como siguen:

- Se agregó cisteína a una concentración acumulativa de aproximadamente 6-7 milimoles por L de cultivo, 8-9 milimoles por L de cultivo, o 10-11 milimoles por L de cultivo.
- Los metales en CDM1 (niveles CDM1 0.5x, 1x, o 1.5x) a niveles 1x se listan a continuación

(donde las concentraciones son previas a la adición del inóculo):

- Fe = 68-83 micromoles por litro de cultivo
- Zn = 6-7 micromoles por litro de cultivo
- Cu = 0.1-0.2 micromoles por litro de cultivo
- Ni = 0.5-1 micromoles por litro de cultivo

Se disminuyen los niveles de cisteína acumulativa a 6-7 milimoles/L color amarillo-marrón reducido sin impacto significante al titulador. Se disminuyen las concentraciones de metal a 0.5x en el color de medio reducido con incremento significante en el titulador. Existe un impacto mínimo al titulador, VCC (concentración de célula viable), viabilidad, amoníaco u osmolaridad (Véase **FIGURA 26A-F**). El efecto de escala pronosticado de contenido de metal y cisteína en valor b* y titulador se muestra en la **FIGURA 27**.

5.3 Evaluación del Efecto de antioxidantes en el valor b*

Se evaluó el efecto del antioxidante, taurina, hipotaurina, ácido tiáctico, glutationa, glicina y vitamina C en color cuando se clavó en CDM gastado que comprende aflibercept. Se incubaron uno o más tubos agitadores con tapón de ventilación de 50 ml con volumen de trabajo de 10 ml (CDM1) se incubaron por 7 días, tomando muestras en el día 0 y día 7.

Las condiciones para adiciones del componente a CDM1 gastado fueron como sigue:

- Muestra de Aflibercept (proteína recombinante de aflibercept en una solución amortiguada acuosa, pH 6.2, que comprende 5 mM de fosfato de sodio, 5 mM de citrato de sodio y 100 mM de cloruro de sodio) clavada en tubos agitadores a concentración de 6 g/L.
- Antioxidantes agregados a CDM1 gastado a las siguientes concentraciones:
  - Taurina = 10 mM de cultivo
  - Hipotaurina = 10 mM de cultivo
  - Glicina = 10 mM de cultivo
  - Ácido tióctico = 0.0024 mM de cultivo
  - Glutationa, reducida = 2 mM de cultivo
  - Hidrocortisona = 0.0014 mM de cultivo
  - Vitamina C (ácido ascórbico) = 0.028 mM de cultivo

Los antioxidantes múltiples disminuyen la formación de color en medio gastado: una combinación de hipotaurina, taurina y glicina; ácido tióctico; y vitamina C. La glutationa incrementa el valor de b*.

Tabla 5-1. Sumario del Efecto Antioxidante en Formación de Color de MiniTrampa

Condición	valor b*
Día 0 del Medio Gastado	0.37
Control de Día 7 del Medio Gastado	1.47
Día 7 del Medio Gastado + Antioxidantes*	1.02

* Antioxidantes que significativamente disminuye el valor b*: Hipotaurina/Taurina/Glicina, Ácido tióctico, Vitamina C.

Un sumario del efecto previsto de varios antioxidantes en el valor b* (espacio de color CIE L*, a*, b*) se muestra en la **FIGURA 28A-28C**.

Se evaluó el efecto de la adición adicional a los antioxidantes en color, clavado en CDM gastado que comprende aflibercept. Se incubaron uno o más tubos agitadores con tapón de ventilación de 50 ml con columna de trabajo de 10 ml (CDM1) por 7 días, tomando muestras en el día 0 y día 7.

Las condiciones para adiciones del componente a CDM1 gastado fueron como sigue:

- Muestra de Aflibercept (proteína recombinante de aflibercept en una solución amortiguada acuosa, pH 6.2, que comprende 5 mM de fosfato de sodio, 5 mM de citrato de sodio y 100 mM de cloruro de sodio) clavada en tubos agitadores a concentración de 6 g/L
- Se corrieron dos experimentos DOE:
- (i) Antioxidantes agregados a CDM1 gastado a las siguientes concentraciones:
  - Taurina = 10 mM de cultivo
  - Hipotaurina = 10 mM de cultivo
  - Glicina = 10 mM de cultivo
  - Ácido tióctico = 0.0024 mM de cultivo
  - Vitamina C (ácido ascórbico) = 0.028 mM de cultivo
- (ii) Antioxidantes agregados para alcanzar las siguientes concentraciones:
  - ATA = 2.5 µM – 5 µM
  - Mesilato de deferoxamina (DFO) = 5 µM – 10 µM
  - Catalasa = 101.5 mg/L
  - S-carboximetil-L-Cisteína = 10 mM

La hipotaurina se encontró por disminuir a formación de color en medio gastado (**FIGURA 28D**). El DFO también significativamente disminuyó la formación de color en medio gastado (**FIGURA 28D**). Los otros antioxidantes no tienen un impacto estadístico en la formación de color.

Tabla 5-2. Sumario del Efecto Antioxidante en MiniTrampa de Formación de Color

Condición	valor b*
Día 0 del Medio Gastado	0.44
Control de Día 7 del Medio Gastado	1.73
Día 7 del Medio Gastado + Hipotaurina	1.32
Día 7 del Medio Gastado + DFO	0.92

Estudio de Antioxidante en Matraz agitado:

Se evaluaron individualmente Taurina, hipotaurina, glicina, ácido tióctico y vitamina C y en combinación para su capacidad para disminuir la formación de color en cultivo de célula (**Tabla 5-3**).

Se inocularon matraces agitados de 250 ml de un cultivo sembrado de una línea de célula que produce aflibercept. Las células inoculadas se hicieron crecer a 35.5°C en incubadoras con control de CO_2 al 5%. La glucosa y alimentos basales se suplementaron a los matraces agitados como se necesite. El proceso descrito anteriormente se usó en donde los metales están presentes a concentración de 0.5x en CDM1 y se agregó cisteína a una concentración acumulativa de 6-7 mM.

Tabla 5-3.

Antioxidante	Nivel 1 0x	Nivel 1 0.5x	Nivel 1 1x
Taurina	0	3.75 mM	7.5 mM
Hipotaurina	0	3.75 mM	7.5 mM
Glicina	2.0 mM	5.75 mM	9.5 mM
Ácido tióctico	1.0 µM	1.9 µM	2.8 µM
Vitamina C	0	11.0 µM	21.0 µM

La Figura 28E muestra el efecto previsto de los antioxidantes en la Tabla 5-3 en el valor b* (espacio de color CIE L*,a*,b*) y titulador final. Taurina, hipotaurina, y glicina significativamente reducen el valor de b* sin impactar negativamente al titulador.

Ejemplo 6. Glicosilación y Estudios de Viabilidad para Producción de Aflibercept Usando

CDM

Se inocularon biorreactores (*por ejemplo,* 2L) de un cultivo sembrado de una línea de célula que produce aflibercept. Los cultivos inoculados se hicieron crecer a una temperatura de 35.5°C, pH de 7.1 ± 0.25, y punto de ajuste de burbujeo de aire de 22 ccm. Glucosa, antiespuma, y alimentos basales se suplementaron a los biorreactores como se necesite. Se llevó a cabo la producción de proteína de aflibercept usando CDM1 (propietario). Se llevó acabo la producción de una línea de célula hospedera que expresa proteína de fusión aflibercept usando CDM 1 (propietario), CDM 2 (comercialmente obtenido), y CDM 3 (comercialmente obtenido). Se llevó a cabo una serie de experimentos usando CDM 1, 2, y 3 sin componentes de medio adicional. Se realizó otro juego de experimentos usando CDMs 1-3 para lo cual se agregaron manganeso (tetrahidrato de cloruro de manganeso, Sigma, 3.2 mg/L), galactosa (Sigma, 8 g/L), y uridina (Sigma, 6 g/L) a los alimentos para modificar el perfil de galactosilación. Por último, se realizaron una serie de experimentos usando CDMs 1-3 al cual se agregaron manganeso (tetrahidrato cloruro de manganeso, Sigma, 3.2 mg/L), galactosa (Sigma, 8 g/L), y uridina (Sigma, 6 g/L) a los alimentos para modificar el perfil de galactosilación y se agregó dexametasona (Sigma, 12 mg/L) a los alimentos para modificar el perfil de sialiación y la composición. Se preparó una recolecta clarificada del CDM por centrifugación seguido por 0.45 µm de filtración.

Las muestras se procesaron por Proteína A antes del análisis N-glicano.

Mediciones del Titulador

A lo largo de estos ejemplos, a menos que se declare de otra forma, se midieron tituladores de aflibercept diariamente usando un Agilent (Santa Clara, CA) 1200 Series HPLC, o equivalente, que opera con un pH bajo, y gradiente de etapa de alusión con detección a 280 nm. Las concentraciones se asignaron con respecto a una curva de calibración estándar de referencia.

Densidad de célula Viable (VCD) y Valores de Viabilidad de la Célula

A lo largo de estos ejemplos, a menos que se describa de otra forma, la densidad de célula viable (VCD) y valores de viabilidad de célula se midieron a través de exclusión de azul tripano mediante contadores de célula automatizados Nova BioProfile Flex (Nova Biomedical, Waltham, MA). Se midieron, mediciones de glucosa, lactosa, pH fuera de línea, oxígeno disuelto (DO), pCO2 y osmolaridad con el Nova BioProfile Flex (Nova Biomedical, Waltham, MA).

Perfiles de Oligosacárido de N-Glicano

Se prepararon aproximadamente 15 µg de muestras procesadas de proteína A de recolecciones de CDM-13 para análisis de acuerdo con el protocolo Waters Glyco Works usando los kits de desglicosilación Glyco Works Rapid y etiquetado Glyco Works RapiFluor (Waters números de parte 186008939 y 186008091, respectivamente). Se removieron N-glicanos de la proteína aflibercept

tratando las muestras con PNGase-F a 50.5°C por 5 minutos, seguido por un enfriado a 25°C por 5 minutos. Los glicanos relacionados se etiquetaron con tinte fluorescente RapiFluor-MS a través de reacción a temperatura ambiente por 5 minutos. La proteína se precipito agregando acetonitrilo a la mezcla de reacción y se peletizó al fondo de la cavidad a través de centrifugación a 2.204 x g por 10 minutos. El sobrenadante que comprende los glicanos etiquetados se recolectaron y analizaron en un UPLC usando cromatografía líquida de interacción hidrofílica (columna Amida Waters BEG) con detección de fluorescencia post-columna. Después se unió a la columna, se separaron los glicanos etiquetados y se eluyeron usando un gradiente de fase móvil binario comprendido de acetonitrilo y 50 mM de formiato de amonio acuoso (pH 4.4). Se detectaron los glicanos etiquetados usando un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 265 nm y una longitud de onda de emisión de 425 nm. Usando los porcentajes de área relativa de los picos N-glicano en los cromatogramas resultantes, se reportó la distribución de N-glicano como el porcentaje total de N-glicanos (1) que contiene un residuo de fucosa del núcleo (Fucosilación Total, **Tabla 6-1**), (2) que contiene al menos un residuo de ácido siálico (Sialilación Total, **Tabla 6-2**), (3) identificado como Manosa-5 (Manosa-5, **Tabla 6-3**), (4) que contiene al menos un residuo de galactosa (Galactosilación Total, Tabla 6-4), y (5) de identidad conocida (Picos identificados Totales, **Tabla 6-5**).

Resultados

Se muestran los resultados de conteo de célula viable (VCC), viabilidad u titulador de recolecta en las **FIGURAS 29-31** para CDMs 1-3 con y sin componentes adicionales.

Entre los nueve cultivos, el cultivo CDM1 que comprende uridina, manganeso, y galactosa muestran el titulador mayor a 12 días (5.5 g/L). El CDM1 sin componentes adicionales también muestra un titulador mayor a 12 días (aproximadamente 4.25 g/L) comparado a los otros siete cultivos (**FIGURA 29**).

Los resultados de viabilidad celular son similares a través de las condiciones variadas hasta el proceso del día 6. Después del proceso del día 7, los cultivos CDM2 y CDM3 con o sin componentes de medio adicionales mostraron más que aproximadamente 90% de viabilidad (**FIGURA 30**).

El cultivo CDM1 con uridina, manganeso y galactosa mostraron el VCC mayores alrededor del día 6 (**FIGURA 31**).

La influencia de cultivos y suplementos tienen un impacto significante en la distribución de N-glicano total (**Tablas 6-1 a 6-5**). Los niveles de glicano se compararon usando aflibercept procesado con proteína A (se evaluaron dos muestras) hechas usando hidrolasa de soya. Los picos identificados totales se listan en la **Tabla 6-5**.

Tabla 6-1. Fucosilación Total (%)

Condición	Día 6	Día 10	Día 12
CDM1	48.75	-	46.26
CDM1 +UMG	49.21	-	44.38
CDM1 + UMG + Dex	48.88	-	46.23
CDM2	-	45.68	45.14
CDM2 +UMG	-	46.36	45.27
CDM2 + UMG + Dex	-	46.92	-
CDM3	49.24	-	45.59
CDM3 +UMG	48.71	-	42.61
CDM3 + UMG + Dex	49.36	-	44.56
Hidrolasa de soya 1	51.37		
Hidrolasa de soya 2	52.43		

U es uridina, M es manganeso, G es galactosa, Dex es dexametasona

Tabla 6-2. Sialilación total (%)

Condición	Día 6	Día 10	Día 12
CDM1	44.06	-	39.14
CDM1 +UMG	43.72	-	35.8
CDM1 + UMG + Dex	43.2	-	36.72
CDM2	-	37.62	36.67
CDM2 +UMG	-	37.57	36.29
CDM2 + UMG + Dex	-	38.06	-
CDM3	44	-	31.21
CDM3 +UMG	42.48	-	30.84
CDM3 + UMG + Dex	43.82	-	32.74
Hidrolasa de soya 1	58.24		
Hidrolasa de soya 2	59.23		

U es uridina, M es manganeso, G es galactosa, Dex es dexametasona

Tabla 6-3. Manosa-5 (%)

Condición	Día 6	Día 10	Día 12
CDM1	6.76	-	10.1
CDM1 +UMG	6.9	-	13.17
CDM1 + UMG + Dex	6.23	-	8.86

Condición	Día 6	Día 10	Día 12
CDM2	-	9.71	11.96
CDM2 +UMG	-	9.44	10.93
CDM2 + UMG + Dex	-	8.21	-
CDM3	2.31	-	12.63
CDM3 +UMG	2.71	-	13.38
CDM3 + UMG + Dex	2.05	-	11.98
Hidrolasa de soya 1	5.19		
Hidrolasa de soya 2	5.24		

U es uridina, M es manganeso, G es galactosa, Dex es dexametasona

Tabla 6-4. Galactosilación total (%)

Condición	Día 6	Día 10	Día 12
CDM1	68.44	-	62.9
CDM1 +UMG	69.25	-	59.02
CDM1 + UMG + Dex	69.05	-	63.26
CDM2	-	65.33	63.68
CDM2 +UMG	-	68.13	66
CDM2 + UMG + Dex	-	69.35	-
CDM3	74.57	-	62.28
CDM3 +UMG	74.82	-	62.2
CDM3 + UMG + Dex	76.48	-	65.18
Hidrolasa de soya 1	79.64		
Hidrolasa de soya 2	80.55		

U es uridina, M es manganeso, G es galactosa, Dex es dexametasona

Tabla 6-5. Picos Identificados Totales (%)

Condición	Día 6	Día 10	Día 12
CDM1	87.28	-	84.67
CDM1 +UMG	88.43	-	83.82
CDM1 + UMG + Dex	87.36	-	83.44
CDM2	-	86.23	86.67
CDM2 +UMG	-	87.81	86.87
CDM2 + UMG + Dex	-	87.53	-
CDM3	86.38	-	86.31

CDM3 +UMG	87.07	-	86.13
CDM3 + UMG + Dex	87.18	-	87.43
Hidrolasa de soya 1	93.93		
Hidrolasa de soya 2	94.74		

U es uridina, M es manganeso, G es galactosa, Dex es dexametasona

La fucosilación total, sialilación total, y galactosilación total y manosa-5 se observó en el día 12 de los cultivos de varios CDMs fue 42.61% a 46.26%, 30.84% a 39.14%, 59.02 a 66% y 8.86% a 13.38%, respectivamente. Estos valores para glicosilación difieren de los valores de glicosilación obtenidos usando hidrolasa de soya.

Por último, se llevaron a cabo las mediciones de color para las recolectas clarificadas obtenidas de células que expresan aflibercept en CDM1, CDM2, y CDM3 suplementados con uridina, manganeso, y galactosa. Los parámetros de operación para las etapas de estudio de biorreactor pueden ser conocidos por uno de experiencia ordinaria en la técnica.

Ejemplo 7. Afinidad de Producción de Proteínas anti-VEGF

7.1 Expresión de MiniTrampa del VEGF

Las regiones codificantes de MiniTrampa de VEGF recombinante (por ejemplo, MT5, SEQ ID NO.: 46) fueron operablemente enlazadas a una secuencia señal, clonada en un vector de expresión de mamífero y transfectada en células de ovario de hámster chino (CHO-K), las combinaciones establemente transfectadas se aislaron después de la selección con 400 µg/ml de higromicina por 12 días. Las combinaciones de célula CHO estables, se hicieron crecer en medio libe de proteína químicamente definido, se usaron para producir proteínas para prueba. Los polipéptidos recombinantes se secretaron de las células en el medio de crecimiento.

Las secuencias de dominios constituyentes de MiniTrampa de VEGF.

- Flt1 Humano (# de acceso NP_001153392.1)
- Flk1 Humano (# de acceso NP_002244.1)
- Fc Humano (IGHG1, # de acceso P01857-1)

La MiniTrampa de VEGF recombinante (MT5) se obtuvo de este proceso y se procesó adicionalmente.

7.2 Preparación de Columnas de Cromatografía de afinidad

Cinco distintas proteínas capaces de unirse a la MiniTrampa de VEGF (MT5) se evaluaron. Las proteínas usadas incluyen un $VEGF_{165}$ (SEQ ID NO.: 72), mAb1 (una IgG1 humana de mAb anti-VEGFR1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 73 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 74 es una cadena ligera); mAb2 (una IgG1 humana de mAb anti-VEGFR1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 75

es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 76 es una cadena ligera); mAb3 (una IgG1 de ratón mAb anti-VEGFR1 donde la SEQ ID NO.: 77 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 78 es una cadena ligera) y mAb4 (una IgG1 de ratón mAb anti-VEGFR1 de ratón donde la SEQ ID NO.: 79 es una cadena pesada y la SEQ ID NO.: 80 es una cadena ligera).

La columna se activó lavando las columnas con 6 volúmenes de columna (CV) de 1 mM de ácido clorhídrico enfriado con hielo a una relación de flujo que no excede 1 ml/min. Diez mg de cada una de las proteínas se cargaron en tres columnas de afinidad HP activadas con NHS HiTrap (1 ml, GE, Healthcare, # de Cat17-0716-01) y las columnas se cerraron para permitir el acoplamiento que se lleva a cabo por 30 minutos a temperatura ambiente. Las columnas se lavaron con 18 volúmenes de columna 0.5 M de acetato de sodio, 0.5 M de NaCl, pH 4.0 y los sitios abiertos se bloquearon con 10 volúmenes de columna de 0.5 M de Tris-HCl, 0.5 M de NaCl, pH 8.3 (los lavados se llevaron a cabo en el siguiente orden: 6 volúmenes de columna de 0.5 M de Tris-HCl, 0.5 M de NaCl, pH 8.3; 6 volúmenes de columna de 0.5 M de acetato de sodio (acetato de sodio: JT Baker, # de cat 3470-01) 0.5 M de NaCl, pH 4.0; 6 volúmenes de columna de 0.5 M de Tris, pH 8.3; se incubó la columna por 30 minutos a temperatura ambiente; 6 volúmenes de columna de 0.5 M de amortiguador de acetato de sodio, 0.5 M de NaCl pH 4.0; 6 volúmenes de columna de 0.5 M de Tris-HCl, 0.5 NaCl, pH 8.3 y 6 volúmenes de columna de 0.5 M de amortiguador de acetato de sodio, 0.5 M de NaCl pH 4.0). Las columnas se almacenaron en DPBS, pH 7.5. Las cinco columnas evaluadas se designaron como columna 1 (que comprende $VEGF_{165}$), columna 2 (que comprende mAb1), columna 3 (que comprende mAb2), columna 4 (que comprende mAb3) y columna 5 (que comprende mAb4).

7.3 Producción de MiniTrampa Usando Cromatografía de afinidad

Preparación de Muestra. Se realizaron dos diferentes procesos de producción para la MiniTrampa. En un caso, el material que comprende una muestra de MiniTrampa se produjo usando cada una de las columnas de afinidad donde el material precursor (MiniTrampa) se diluyó en amortiguador DPBS 1X a 20 mg/ml y se aplicó a la columna y se incubó a TA por 30 minutos. Usando la columna de afinidad, se aisló la MiniTrampa de ~700 ppm de HCP.

Alternativamente, se usó el sobrenadante de cultivo recolectado el cual comprende 0.4 mg/ml de proteína en el sobrenadante y se cargó en las columnas de afinidad diferente (1-5) separadamente. No se realizó dilución adicional. Las columnas de afinidad después se lavaron con 9 CV de amortiguador DPBS 1X seguido por elución de las proteínas con amortiguador de elución IgG, pH 2.8 (Thermo, # de cat21009). El material MiniTrampa obtenido como se describe anteriormente después se filtró a través de un filtro de 0.45 µm o se centrifugó antes de cargarlo en las columnas preparadas como se describe en la sección 7.2 anterior. Se cargó veinticinco ml de solución de carga que comprende aproximadamente 0.4 mg/ml de proteína en cada una de las columnas y se incubó

por 20 minutos. Cada columna se lavó con 9 CV de DPBS (Invitrogen, # de cat 14190-144) antes de la elución para equilibrio. La cantidad de MT5 en las fracciones de lavado se muestra en la **Tabla 7-1**. Los lavados se siguen por elución usando 6 CV de pH 2.8 (Commercial Elution Buffer, (Thermo Cat#21009) y 100 nM de amortiguador de glicina pH 2.5 y las fracciones se neutralizaron rápidamente con la adición de 1M de Tris, pH 7.5 (Invitrogen, # de cat 15567-027). La cantidad de MiniTrampa en las fracciones eluidas también se muestran en la Tabla **7-1**.

La MiniTrampa (MT5) fue exitosamente producida de todas las cinco columnas de afinidad. El rendimiento de la columna con $VEGF_{165}$ fue mayor que el comparado a columnas mAB1 y mAb2. La mAb3 mAb4 que comprende mAb anti-VEGFR humanizada también muestra producción exitosa de MT5 con similar rendimiento a mAb1 y mAb2. En la **Tabla 7-1**, el rendimiento esperado fue calculado con base en 100% de eficiencia de conjugación y 1:1 relación molar de proteína capturada con afinidad a MT5.

Tabla 7-1.

Columna de afinidad	**Columna 1 $VEGF_{165}$**	**Columna 2 mAb1**	**Columna 3 mAb2**	**Columna 4 mAb3**	**Columna 5 mAb4**
Cantidad de conjugación (mg)	10	10	10	10	10
carga (mg)	21.2	21.2	21.2	20.1	20.1
esperado (mg)	~12	~3.2	~3.2	~3.2	~3.2
lavado (mg)	14.9	13.2	12.6	15.2	14.7
Eluir (mg)	4.8	1.6	1.8	1.5	1.6

7.4 Estudio de Estabilidad de Columna

Se llevaron a cabo múltiples corridas usando columnas 1 y 2 siguiendo el método descrito en la sección 7.3 (Tabla 7-2 para la columna 1 y Tabla 7-3 para la columna 2).

Tabla 7-2.

Rendimiento de producción							
# de corrida	1	2	3	4	5	6	7
carga (mg)	21.2	19.7	19.7	19.7	19.6	19.6	19.6
lavado (mg)	14.9	13.5	15.0	15.0	14.6	14.6	14.3
Eluir (mg)	4.8	5.4	5.2	4.8	5.2	4.6	4.8

Tabla 7-3.

Rendimiento de producción							
# de corrida	1	2	3	4	5	6	7
carga (mg)	21.2	19.7	19.7	19.7	19.6	19.6	19.6
lavado (mg)	13.2	16.0	16.4	16.4	17.1	17.2	17.2
Eluir (mg)	1.6	1.8	1.8	1.8	2.0	2.0	2.0

Las columnas se almacenaron a 4°C por aproximadamente 5 semanas. Se eluyó una cantidad similar de MT5 de cada producción que demuestra buena estabilidad de columna.

7.5 Estudio de Estabilidad de la MiniTrampa de VEGF producido

Se realizó el análisis SDS-PAGE de las fracciones eluidas de las tres columnas (columna 1, columna 2 y columna 3). Las muestras se prepararon en amortiguador de muestra SDS-PAGE y se corrieron en un gel Tris bis- NuPage de gradiente a 4-12% usando MES 1X (no. Cat NP0322, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Las cavidades se cargaron con (1) peso molecular estándar, (2) solución de carga, (3) columna 1 del lavado de columna, (6) fracción eluida de la columna 3, (7), MT5 almacenada a pH 2.8 por 1 minuto (8) MT5 almacenada a pH 2.8 por 30 minutos, y (9) peso molecular estándar (FIGURA 33 Y FIGURA 34). El análisis demostró que las fracciones obtenidas de las fracciones eluidas de todas las tres columnas de afinidad (columnas 1-3) mostraron perfiles de tamaño similar y el uso de las columnas de afinidad no desestabilizan la MiniTrampa.

7.6 Cálculo de Nivel de Proteína de Célula Hospedera

Se obtuvo una curva estándar de concentración de proteínas de célula hospedera usando el Kit ELISA HCP CHO, 3G (F550) (Cygus Technologies) (**FIGURA 32** y **Tabla 7-4**). La cantidad de HCPs en las soluciones de carga y las fracciones eluidas se calcularon usando la curva estándar como se describe en la **FIGURA 32** y la fórmula de curva se lista en la **Tabla 7-4**.

Tabla 7-4.

Fórmula de curva	**asíntota baja**	**traslape**	**EC_{50} (ng/mL)**	**asíntota alta**	**R^2**
Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D	0.2	1.9	32.9	2.3	1

Se calcularon los HCPs totales usando la curva estándar y la carta con la cantidad total de las proteínas de célula hospedera se muestra en la **FIGURA 35A**. La **FIGURA 35B** también muestra la cantidad total de las proteínas de célula hospedera en la carga comparada a los lavados y fracciones eluidas de las columnas 1, 2, 4 y 5. Se llevaron a cabo corridas múltiples usando las columnas y el

(#) en la **FIGURA 35B** representa la corrida de la cual la fracción se evaluó.

El uso de afinidad de captura usando proteínas capaces de unirse a la MiniTrampa mostró una reducción eficiente de HCPs de aproximadamente 25-50 ppm. Como se observa para el rendimiento, la columna con $VEGF_{165}$ mostró pureza alta de la MiniTrampa de HCPs que muestra por columnas mAb1 y mAb2.

7.7 Perfiles SEC de Producción de Afinidad Antes y Después de la MiniTrampa VEGF

Se compararon los perfiles SEC de las fracciones eluidas de tres columnas (columnas 1-3) al perfil SEC de MiniTrampa en la solución de carga. Como se observa en la **FIGURA 36** y **Tabla 7-5**, los perfiles SEC del MT5 antes o después de la producción de afinidad son muy similares.

Tabla 7-5.

No. de pico como en la Figura 36	**Tiempo de retención**	**% de área de pico**	**Tiempo de retención**	**% de área de pico**	**Tiempo de retención**	**% de área de pico**	**Tiempo de retención**	**% de área de pico**
	solución de carga		**Columna 1 Eluida**		**Columna 2 Eluida**		**Columna 3 Eluida**	
1	6.8	1.8	6.8	1.2	6.9	1.1	7.0	1.2
2	7.8	94.6	7.9	97.2	7.9	97.3	7.9	98.3
3	9.4	3.6	10.2	1.7	11.4	1.6	11.3	0.5

7.8 Cinética de MiniTrampa de Muestras de Pre y Post Columna unidas a mAb1, mAb2 y $VEGF_{165}$

Se realizaron estudios de cinética usando un instrumento Biacore T200.

Se determinaron las constantes de disociación de equilibrio (valores K_D) para $VEGF_{165}$ unido a MiniTrampa en los eluidos de las columnas 1 y 2 y solución de carga usando un biosensor de resonancia de plasmón de superficie de tiempo real usando un instrumento Biacore T200. Todos los estudios de unión se realizaron en 10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA, y 0.05% en p/p de Tensoactivo Tween-20, pH 7.4 (HBS-ET) amortiguador de corrida a 25°C. La superficie de sensor Biacore primero de derivatizó por amina acoplada con un mAb1 a MT5 de captura. Se muestra una representación de dibujo del estudio de unión en la **FIGURA 37**.

De manera breve, los eluidos de las columnas y solución de carga se diluyeron en un amortiguador

HBS-EP (Biacore) y se inyectó a través de las matrices de proteína inmovilizada a un nivel de captura de ~70 RUs. El VEGF165 después se inyectó a una velocidad de flujo de 50 µl/min. La concentración equivalente del analito se inyectó simultáneamente sobre una superficie de referencia sin tratar para servir como un sensorgrama blanco para sustracción del volumen antecedente de índice refractivo. La superficie de chip sensor se regeneró entre ciclos con dos inyecciones de 5 min de 10 mM de Glicina, a 25 µL/min. Los sensorgramas de unión experimental resultante después se evaluaron usando el software 4.0.1 de evaluación BIA para determinar los parámetros de relación cinética. Las series de datos para cada muestra se ajustaron al modelo Langmuir 1:1. Para estos estudios, se analizaron los datos de unión y disociación bajo el protocolo de Análisis de Ajuste Global mientras se selecciona el ajuste localmente para capacidad de unión del analito máximo (RU) o atributo Rmáx. En este caso, el software calculó una constante de disociación (kd), constante de asociación (ka) y constante de afinidad (Kd). La constante de disociación de equilibrio es K_D=kd/ka. Se determinaron la constante de asoc cinética, la constante de disoc cinética y las afinidades totales usando diferentes concentraciones de $VEGF_{165}$ en el rango de 0.03-2 nM (**Tabla 7-6**). Se calcularon las semi-vidas disociativas (t½) se calcularon de las constantes de velocidad cinética como: $t_{1/2}$ = ln(2)/60*Kd. Los parámetros de cinética de unión para MT5 a $VEGF_{165}$ obtenidas de antes y después de la producción de cromatografía de afinidad a 25°C se muestran en la **Tabla 7-6**.

La afinidad (KD), velocidad asoc (ka, M-1s-1) y velocidad disoc (kd) para MT5 producida por cromatografía de afinidad comparada a solución de carga para valorar los efecto(s) de etapa de cromatografía de afinidad no muestra cambios en los cinéticos de MT5 de muestras diferentes. Los sensorgramas SPR de los constructos de MiniTrampa de VEGF se muestran en la **FIGURA 38**.

Tabla 7-6.

MiniTrampa de muestras VEGF	**k_a (10^6 $M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (10^{-5} s^{-1})**	**K_D (10^{-12} M)**	**t½ (min)**	**Chi^2 (RU^2)**	**$R_{máx}$ (RU)**
Solución de carga	9.44	1.74	1.84	664	0.10	20
columna 2 eluida	8.83	1.49	1.69	775	0.17	28
columna 1 eluida	12.18	1.80	1.48	641	0.18	19

7.9 Ciclos de Producción Múltiple

Se llevó a cabo la producción cromatográfica de recolectas como se obtienen por la etapa 7.1 usando la columna 1 ($hVEGF_{165}$) y columna 2 (mAb1) como se muestra en 7.3. Se usaron las columnas para

ciclos cromatográficos múltiples. Los rendimientos en las columnas no varían significativamente debido a las corridas adicionales, sugiriendo que las columnas retienen la capacidad de unión (**Tabla 7-7**).

Tabla 7-7.

Rendimiento de producción								
Columna de afinidad	**Columna 1**				**Columna 2**			
# de corrida	**1**	**2**	**3**	**4**	**1**	**2**	**3**	**4**
carga (mg)	21.2	19.7	19.7	19.7	21.2	19.7	19.7	19.7
lavado (mg)	14.9	13.5	15.0	15.0	13.2	16.0	16.4	16.4
Eluido (mg)	4.8	5.4	5.2	4.8	1.6	1.8	1.8	1.8

Los cálculos HCP en las soluciones de carga, fracciones de lavado y fracciones eluidas para las columnas 1 y 2 se obtuvieron usando el método descrito en 7.4 (**FIGURA 39**). Los HCP totales calculados mostraron que el uso repetido de las columnas no reduce la capacidad de las columnas para unirse a MiniTrampa.

7.10 Optimizar las Columnas Cromatográficas de Afinidad

La producción cromatográfica de material recolectado como se obtiene en la sección 7.1 se realizó usando la columna 1 ($VEGF_{165}$) y columna 2 (mAb1). Para los estudios de optimización, 14 mg o 45 mg en lugar de 10 mg del VEGF165 en el mAb anti-VEGFR1 cargado en dos columnas de afinidad HP activadas con NHS HiTrap (1 ml, GE Healthcare) y las columnas se cerraron para permitir el acoplamiento que se lleva a cabo por 30 minutos a temperatura ambiente. Se llevó a cabo la preparación de columna y producción de lo recolectado que incluye la MiniTrampa como se describe en 7.2 y 7.3 anterior. La cantidad de MT5 en el lavado y fracciones eluidas se muestra en la TABLA 7-8. La columna de afinidad de comparación con 14 mg o 45 mg ($VEGF_{165}$ o mAb anti-VEGFR1 (mAb1)) cantidad de conjugación en lugar de 10 mg muestra un rendimiento incrementado de MiniTrampa de ambas columnas. Así, el rendimiento de columna usando el método resumido puede ser mejorado optimizando la proteína a relación de columna o incrementando la eficiencia de conjugación cambiando el pH, tiempo de incubación, temperatura de incubación, *etc*.

Tabla 7-8.

Columna de afinidad	**($hVEGF_{165}$)**	**(mAb anti-VEGFR1 de ratón)**

MW (kDa)	~ 40 (Dímero)		145	
cantidad de conjugación (mg)	10	14	10	45
carga (mg)	21.2	45.5	21.2	45.5
lavado (mg)	14.9	36.8	13.2	29.2
Eluido (mg)	~5.0	7.6	~1.8	5.5

7.11 Uso de CEX con la cromatografía de afinidad

Se produjo una muestra de cultivo de célula de expresión MT5 usando la columna 1 como se describe en la sección 7.3 anterior. Lo eluido obtenido se sometió a columna de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) (HiTrap Capto S, 1 ml). Las condiciones de operación de la columna se muestran en la Tabla 7-9.

Tabla 7-9.

Etapas	**Afinidad**	**Intercambio Catiónico (CEX)**
Columna	Afinidad de columna, 1mL	HiTrap Capto S, 1mL
Carga	MT5 CM2926	20 mM de Acetato, pH 5.0 (Carga/Lavado 1)
Lavado	1X DPBS pH 7.2	10 mM Fosfato, pH 7.0
Elución	Amortiguador de elución IgG de Pierce™	50 mM de Tris, 62.5 mM $(NH_4)_2SO_4$, pH 8.5
Regeneración/ Extracción	10 mM de glicina a pH 2.5	50 mM de Tris, 1 M $(NH_4)_2SO_4$, pH 8.5

La HCP total en la muestra de cultivo celular de partida/origina, lo eluido de la columna de cromatografía de afinidad 1 y la elución de CEX fue aproximadamente 230,000 ng/mL, aproximadamente 9,000 ng/mL y aproximadamente 850 ng/mL, respectivamente. Las cantidades de HCP se determinaron cuantificadas usando el Kit ELISA Cygnus CHO HCP ELISA Kit, 3G, como se menciona anteriormente.

7.12 Uso de Cromatografía de Afinidad para Producir Otras Proteínas Anti-VEGF

La columna 1 se evaluó para estudiar su capacidad para producir otras proteínas anti-VEGF. Se usaron aflibercept y un fragmento de scFv con unión potencial del VEGF para este estudio. Los procesos de producción se llevaron a cabo como se discute en la Sección 7.3. La **Tabla 7-10**

demuestra que la columna 1 fue exitosa en la unión y elución de otras proteínas anti-VEGF.

Tabla 7-10.

Columna de Afinidad 1	**scFv**	**Aflibercept**
Carga (mg)	10	20
Lavado (mg)	4.5	10.6
Elución (mg)	3.6	10.2

Ejemplo 8. Caracterización a Base de Espectrometría de Masas de Constructos de MiniTrampa del VEGF

Materiales. Se produjo la MiniTrampa del VEGF (MT1) a partir de aflibercept como se describe en el Ejemplo 1. Se produjo la MiniTrampa del VEGF 5 (MT5) como se describe en el Ejemplo 7. Se produjo la MiniTrampa del VEGF (MT6) por el siguiente método: las regiones codificantes de la MiniTrampa del VEGF (MTE) recombinante se ligaron operablemente a una secuencia señal y se clonó en un vector de expresión de mamífero, y se transfectó en células de ovario de hámster chino (CHO-K1) y se aislaron combinaciones establemente transfectadas después de la selección con 400 µg/mL de higromicina por 12 días. Las combinaciones de células CHO estables, que crecen en CDM se usaron para producir proteínas para análisis.

8.1 Desglicosilación de Glicoproteínas.

Muestras de recolección clarificada de MT1, MT5 y MT6 se diluyeron o reconstituyeron a una concentración de 0.52 mg/mL en una solución de 28.8 µL de 1% (p/v) de tensoactivo RG (RapiGest SF, Waters, Milford, MA) y 50 mM de HEPES (pH 7.9). Estas soluciones se calentaron a aproximadamente 95 °C durante 2 min, se dejaron enfriar a 50 °C, y se mezclaron con 1.2 µL de solución PNGase F (GlycoWorks Rapid PNGase F, Waters, Milford, MA). La desglicosilación se completó por incubación de las muestras a 50 °C por 5 min.

8.2 Análisis de HILIC-Fluorescencia-ESI-MS (MS/MS).

Se analizó MT1 mediante separación de HILIC combinada con fluorescencia y detección espectrométrica de masas. Se analizaron MT5 y MT6 usando solamente HILIC. La cromatografía se realizó una Waters 2D Acquity UPLC equipada con arreglo de fotodiodo y detectores de fluorescencia (FLR) e interfaz con un espectrómetro de masas Waters Synapt G2-S (condiciones MS). Se usó cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) en modo de separación con una columna Waters UPLC Glicano BEH Amida, 150 × 2.1 mm, 1.7 µm. La temperatura de la columna se ajustó a 60°C y la temperatura del automuestreador se ajustó a 5°C. El volumen de inyección fue

50 µL. El intervalo de barrido de arreglo de fotodiodo fue 190–700 nm. La FLR se ajustó a excitación de 265 nm, emisión de 425 nm para glicanos etiquetado con RapiFluor y excitación de 274 nm, y emisión de 303 nm para tirosina presente en los glicopéptidos. La velocidad de flujo inicial fue 0.4 mL/min con fase móvil A que comprende 100 nM de formiato de amonio (pH 4.4) y la fase móvil B es acetonitrilo.

8.3 Condiciones de MS

Se condujeron experimentos de cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS) usando un espectrómetro de masas Waters Synapt G2-S. El intervalo de barrido fue relación de masa a carga 100–2400 para análisis en modo de ion negativo y positivo. El tiempo de barrido fue 1 s, y el glu-fibrinopéptido B fue constantemente infundido (2 µL/min) como un calibrante ("masa de bloqueo"). El voltaje calipar se ajustó a 2.5 kV, con una temperatura de fuente de 120°C y la temperatura de desolvatación de 500°C. El flujo de gas de nebulizador de nitrógeno se ajustó a 700 l/h.

8.4 SEC-MS Nativo

El sistema ACQUITY UPLC clase I (Waters, Milford, MA) se acopló a espectrómetro de masas cuadrúpolo-Orbitrap híbrido Q Exactivo HF (Thermo Scientific, Bremen, Germany) para todos los análisis de SEC-MS en línea. La columna ACQUITY UPLC Proteína BEH SEC (200Å, 1.7 µm, 4.6 × 300 mm) se ajustó a 30 °C y se usó para separación de proteína. La fase móvil fue 100 mM de acetato de amonio a pH 6.8. Cada separación fue de 30 minutos con una velocidad de flujo de 0.3 mL/min, y la cantidad de inyección se ajustó a 40 µg. Los siguientes parámetros de MS se usaron para la adquisición de datos de SEC-nano-ESI-MS en línea. Cada adquisición fue de 25 minutos comenzando inmediatamente después de la inyección de la muestra. Las muestras desglicosiladas se ionizaron en modo positivo con voltaje rocío de 3 kV, 200 °C de temperatura capilar, y nivel 70 de S-lente RF. El CID en la fuente se ajustó a 75 eV. Los barridos MS completos se adquirieron a potencia de resolución de 15 K con intervalo de masa entre *m/z* 2000-8000. Se usó un tiempo de inyección máximo de 100 ms, se usaron un valor objetivo de control de ganancia automático de 3e6, y 10 microbarridos para los barridos de MS completos.

8.5 Mapeo Peptídico

Preparación de la muestra para mapeo peptídico. La reducción se logró por la adición de 500 mmol/L de ditiotreitol (DTT) a una concentración final de 5 mmol/L seguido por incubación a 4 °C por 60 min. La alquilación se realizó agregando 500 mmol/L de yodoacetamida (IAM) a una concentración final de 10 mmol/L e incubó a 4 °C por 60 min en la oscuridad. El amortiguador desnaturalizante se intercambió por amortiguador de digestión (1 mol/L de urea en 0.1 mol/L de Tris, pH 7.8) usando columnas de desalación de exclusión de tamaño Zeba™ Spin 7 K MWCO (P/N 89882) (Thermo Scientific, Waltham, MA) de conformidad con las instrucciones del fabricante. La

tripsina porcina recombinante (adquirida de Sigma, Cat # 03708985001) se agregó a una relación de masa 1:18 (enzima: muestra)(con base en la concentración de la proteína de MiniTrampa del VEGF como se mide por espectrofotometría UV-Vis después del intercambio de amortiguador), la concentración de las proteínas de MiniTrampa del VEGF se ajustó a 0.5 µg/µL y la digestión se dejó proceder durante una incubación de 4 h a temperatura ambiente. Cuando la digestión se completó, se agregó 0.1% de ácido fórmico en agua grado LC-MS a una relación de volumen 1:1. Las digestiones se almacenaron a −80 °C hasta el análisis.

Análisis de LC-MS/MS de digestiones trípticas. Uno o más de 2.5 µg (10 µL) de digestiones peptídicas se cargaron mediante automuestreador sobre una columna C18 encerrada en un horno de columna con termostato ajustada a 40 °C. Las muestras se mantuvieron a 7 °C mientras se ponen en cola para inyección. El método cromatográfico se inició con 98% de Fase Móvil A (0.1% de fracción de volumen de ácido fórmico en agua) y 2% de Fase Móvil B (0.1% de volumen de fracción de ácido fórmico en acetonitrilo) con la velocidad de flujo establecida a una constante de 0.200 mL/min. Después de un lavado de 10 min, los péptidos se eluyeron sobre un gradiente de 110 min en el cual el contenido de la Fase Móvil B se elevó a una velocidad de 0.39% por minuto para alcanzar una composición final que comprende 45% de Fase Móvil B. Previo a la siguiente inyección de la muestra, la columna se lavó por 15 min con 97% de Fase Móvil B, después se equilibró a 98% de Fase Móvil A por 25 min. Lo eluido se desechó a la basura por los primeros 1.5 minutos y 5 minales finales de la corrida. Los péptidos que eluyen de la columna de cromatografía se analizaron por absorción UV a 214 nm seguido por espectrometría de masas en el LTQ Orbitrap Elite o Discovery XL. Los datos del mapeo peptídico replicados se recolectaron para muestras de PS 8670 y RM 8671 para incluir los análisis de MS en serie (MS/MS) y un análisis de MS solamente cada uno. Los análisis de MS/MS se realizaron para identificación del péptido en el modo dependiente de datos en el cual un ciclo de experimentos consiste en un barrido MS completo de 300 *m/z* a 2000 *m/z* seguido por cinco eventos de MS/MS secuenciales realizado en el primero hasta el quinto de los iones más intensos detectados en un conteo de umbral mínimo de 500 en el barrido MS que inicia en tal ciclo. El objetivo AGC de espectrometría de masas secuencial (MS^n) se ajustó a 1E4 con microbarridos = 3. La trampa iónica se usó en el modo centroide a una velocidad de barrido normal para analizar los fragmentos MS/MS. Los barridos MS completos se recolectaron en modo perfil usando el analizador FTMS de alta resolución (R = 30,000) con un objetivo AGC de barrido completo de 1E6 y microbarridos = 1. Se seleccionaron los iones para MS/MS usando una amplitud de aislamiento de 2 Da, después se fragmentaron por disociación inducida por colisión (CID) con gas de helio usando una energía CID normalizada de 35, una activación Q de 0.25 y un tiempo de activación de 10 mseg. Un estado de carga por omisión se ajustó a z = 2. Las masas dependientes

de los datos se colocaron en la lista de exclusión para 45s si el ion precursor activó un evento dos veces dentro de 30s; la amplitud de la masa de exclusión se ajustó a ±1 Da. El rechazo del estado de carga se permitió para los estados de carga no asignados. Una lista de masa de rechazo incluye contaminantes comunes a 122.08 *m/z*, 185.94 *m/z*, 355.00 *m/z*, 371.00 *m/z*, 391.00 *m/z*, 413.30 *m/z*, 803.10 *m/z*, 1222.10 *m/z*, 1322.10 *m/z*, 1422.10 *m/z*, 1522.10 *m/z*, 1622.10 *m/z*, 1722.10 *m/z*, 1822.10 *m/z*, y 1922.10 *m/z*. Se realizaron análisis de MS solamente para la generación de mapa de péptido no reducido TIC y mapas reducidos.

8.6 Resultados

Estructura de Constructos de MiniTrampa del VEGF. Las estructuras de MiniTrampas del VEGF MT1, MT5 y MT6 se representan en la **Figura 40**, **Figura 41**, **Figura 43** y **Figura 44**.

El análisis inicial de masas usando SEC-MS confirmó las identidades de todas las tres moléculas al nivel de proteína intacta después de la glicosilación (**Figura 42**). La Cromatografía Iónica Total (TIC) del análisis de SEC-MS nativo demuestra detección de moléculas intactas de MiniTrampa del VEGF a alrededor de 12-13 minutos. La expansión de la región de bajo peso molecular (LMW) de la TIC mostró la presencia de impurezas de LMW en todas las tres muestras de proteínas.

El espectro de masas desconvolucionado para las MiniTrampas del VEGF confirmó además su identidad y datos proporcionados para elucidación de los PTMs mayores presentes en las muestras que comprenden MT1 y MT5 (**Figura 43**), las cuales son dímeros y MT6 (**Figura 44**) las cuales son una proteína de cadena única.

Análisis de la Muestra MT1. Las especies de LMW identificadas a partir de la TIC del análisis de SEC-MS de las muestras que comprenden MT1 se extrajeron para examinar tres distintas impurezas de LMW – LMW1, LMW2, y LMW3 (**Figura 45A** y **Figura 45B**). Las especies de LMW1 comprenden especies truncadas de aflibercept. Especies de LMW2 comprenden la impureza Fc presente en la muestra forman la escisión de aflibercept la cual se realizó para producir la MiniTrampa. Las especies de LMW3 comprenden un monómero posiblemente escindido de la molécula de MT1 (dímero).

La muestra MT1 no muestra la presencia de la enzima FabRICATOR, la cual ha sido usada para escindir aflibercept para formar una proteína de MiniTrampa. La enzima, si se presenta, se detecta a aproximadamente 11.5 y 12.5 minutos. No se detectó tal pico durante el análisis de SEC-MS de la muestra MT1 (**Figura 46**).

Análisis de la Muestra MT5. Las especies de LMW identificadas a partir de la TIC del análisis de SEC-MS de las muestras que comprenden MT5 se extrajo para examinar la presencia de dos impurezas de LMW distintas – LMW1 y LMW2 (**Figura 47**).

Análisis de la Muestra MT6. Las especies de LMW identificadas a partir de la TIC del análisis de

SEC-MS de las muestras que comprenden MT1 se extrajo para examinar la presencia de tres impurezas de LMW distintas – LMW1, LMW2, y LMW3 (**Figura 48**). Las especies de LMW2 comprenden un fragmento de MT6 en donde la escisión produce el fragmento de MiniTrampa del VEGF con el enlazador G4S (SEQ ID NO.: 111). Las especies de LMW5 comprenden un fragmento del MT6 en donde la escisión ocurre directo antes o después del enlazador G4S (SEQ ID NO.: 111). Los glicanos en la muestra MT6 se identificaron por su orden de masa y elución en el método de cromatografía de HILIC usando el valor de unidad de glucosa iniciadores por Waters y el National Institute for Bioprocessing Research and Training (Dublin, Ireland) (**Figura 49A** y **Figura 49B**).

Cuantificación de Tiol Libre. Los residuos de cisteína de los constructos de la MiniTrampa del VEGF pueden ser involucrados en la formación del(los) enlace(s) disulfuro intra- e intermolecular, o pueden existir como tioles libres. La presencia de enlaces disulfuro en péptidos y proteínas se han mostrado por imponer rigidez conformacional en una proteína. Los tioles pueden ser detectados por una variedad de reactivos y técnicas de separación. El análisis de los tres constructos e MiniTrampa del VEGF para un nivel muy bajo de tioles libres se muestra en la **Tabla 8-1**.

Tabla 8-1.

Ubicación	**Péptido (sitio de cisteína libre)**	**MT1**	**MT5**	**MT6**
VEGFR1	ELVIP**C**R (SEQ ID NO.: 81)	<0.1%	<0.1%	<0.1%
VEGFR2	LVLN**C**TAR (SEQ ID NO.: 82)	0.3%	0.3%	0.3%
Bisagra Fc	THT**C**PP**C**PAPELLG (SEQ ID NO.: 83)	0.0%	0.0%	N/A

Cuantificación de Trisulfuro. Similar a los tioles libres en residuos de Cys de los constructos de la MiniTrampa del VEGF, los enlaces de trisulfuro pueden influenciar la estructura de la proteína. El análisis de los tres constructos de la MiniTrampa del VEGF bajo condiciones con nivel muy bajo de tioles libres se muestra en la **Tabla 8-2**.

Tabla 8-2.

Ubicación	**Péptido**	**MT1**	**MT5**	**MT6**
VEGFR1	ELVIP**C**R – EIGLLT**C**EATVNGHLYK (SEQ ID NO.: 84)	0.1%	<0.1%	0.1%
VEGFR2	LVLN**C**TAR - SDQGLYT**C**AASSGLMTK(K) (SEQ ID NO.: 85)	<0.1%	<0.1%	<0.1%

Ubicación	Péptido	MT1	MT5	MT6
Bisagra Fc	THT**C**PP**C**PAPELLG - THT**C**PP**C**PAPELL(G) (SEQ ID NO.: 86)	1.5%	3.7%	N/A

Disulfuro intra-cadena en la región de bisagra. Los enlaces disulfuro mal apareados en la región de bisagra pueden tener implicaciones en la estructura, función y estabilidad de los constructos de la MiniTrampa del VEGF. Los análisis de los tres constructos de la MiniTrampa del VEGF para enlaces disulfuro muy bajos o no intra-cadena en la región de bisagra de los constructos de la MiniTrampa del VEGF cs [THTC*PPC*PAPELLG, C* muestra en donde se puede formar el enlace disulfuro intra-cadena] (SEQ ID NO.: 83) se muestran en la **Tabla 8-3**.

Tabla 8-3.

Péptido	MT1	MT5	MT6
Disulfuro	<0.1%	<0.1%	N/A
Trisulfuro	<0.1%	<0.1%	N/A

Cuantificación de isómero de enlace disulfuro paralelo y cruzado. Para MT1 y MT5, los cuales son dímeros conectados por enlaces disulfuro paralelos en las regiones de bisagra, existe una posibilidad de isómeros en donde los enlaces disulfuro en la región de bisagra pueden ser cruzados (**Figura 50**).

La cuantificación de tipos de enlace disulfuro, paralelo contra cruzado, mostró que la proteína MT5 recombinantemente expresada tiene un nivel ligeramente superior de puente de disulfuro cruzado en la región de bisagra Fc comparada con la MT1 – la cual es una molécula digerida con FabRICATOR (**Tabla 8-4**).

Tabla 8-4.

Disulfuro	MT1	MT5	MT6
Cruza	0.2%	3.9%	N/A
Paralelo	99.8%	96.1%	N/A

Modificaciones Post-Traduccionales (PTMs).

Tabla 8-5.

PTM	Sitio	Péptido Modificado		MT1	MT5	MT6
Desamidación	Asn84 (Asn319)	EIGLLTCEATV**N**GHLYK (SEQ ID NO.: 87)	Succinimida	3.1%	3.2%	3.2%
			Asp/iso Asp	21.9 %	18.9 %	20.9 %

PTM	Sitio	Péptido Modificado		MT1	MT5	MT6
	Asn99 (Asn334)	QT**N**TIIDVVLSPSHGIELSVGEK (SEQ ID NO.: 88)	Succinimida	4.6%	4.6%	4.0%
			Asp/iso Asp	0.7%	0.5%	0.6%
Oxidación	Met10	SDTGRPFVE**M**YSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 89)		1.8%	2.1%	2.1%
	Met20	SDTGRPFVEMYSEIPEIIH**M**TEGR (SEQ ID NO.: 90)		2.9%	3.0%	2.7%
	Met245	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSDTGRPFVE**M**YSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 91)		-	-	1.4%
	Met255	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIH**M**TEGR (SEQ ID NO.: 92)		-	-	2.7%
	Met163 (Met398)	TQSGSE**M**K (SEQ ID NO.: 93)		4.3%	4.3%	3.8%
	Met192 (Met427)	SDQGLYTCAASSGL**M**TK (SEQ ID NO.: 94)		5.0%	5.0%	4.2%
Pérdida de glicina C-terminal	Gly211	THTCPPCPAPELL**G** (SEQ ID NO.: 95)		0.1%	2.0%	-

La evaluación de PTMs en todos los tres constructos de la MiniTrampa del VEGF mostró niveles comparables de PTMs (**Tabla 8-5**). La desamidación observada en Asn84 para formar succinimida estuvo en el intervalo de aproximadamente 3.1-3.2% y para formar ácido aspártico/ácido iso aspártico fue 18.9 - 21.9%. La oxidación de varios residuos de metionina (*por ejemplo,* Met10, Met 20m Met163 y Met192) se observó en el intervalo de aproximadamente 0.7-6.8% para todos los tres constructos de la MiniTrampa del VEGF. MT6, la cual, contrario a MT1 y MT5, comprende un enlazador, mostró oxidación de residuos de metionina adicionales en el enlazador (*por ejemplo,* Met245 y Met255). Aproximadamente 0.1% y 2.0% de la glicina C-terminal (Gly211) en MT1 y MT5 mostró una pérdida de glicina. Esto no se observó para MT6, la cual carece de una glicina C-terminal. Las modificaciones del producto final de glicación avanzada relacionadas a glicación de lisina y arginina. La glicación de los constructos de la MiniTrampa del VEGF puede alterar su estructura y

función, conduciendo a la actividad anti-VEGF alterada.

Tabla 8-6.

Sitio	PTM	MT1	MT5	MT6
Arg5	3-Desoxiglucosona	8.0%	8.1%	9.2%
	Glicación	0.1%	0.1%	0.1%
	Carboximetilación	1.5%	1.4%	1.4%
Arg153	3-Desoxiglucosona	<0.1%	<0.1%	<0.1%
Arg96	3-Desoxiglucosona	<0.1%	<0.1%	<0.1%
Lys62	Glicación	1.1%	1.1%	1.3%
	Carboximetilación	<0.1%	<0.1%	<0.1%
Lys68	Glicación	0.4%	0.3%	0.5%
Lys149	Glicación	0.6%	0.5%	0.6%
	Carboximetilación	<0.1%	<0.1%	<0.1%
Lys185	Glicación	<0.1%	<0.1%	<0.1%

La evaluación de modificaciones en todos los tres constructos de la MiniTrampa del VEGF mostró niveles comparables (**Tabla 8-6**).

Sitios modificados. Los sitios modificados en los constructos de la MiniTrampa del VEGF, como se aclara por el análisis de masas intacto por la Sección 8.4, se confirmaron y cuantificaron usando mapeo peptídico reducido como se ilustra en la Sección 8.5 (**Tabla 8-7**). El sitio T90N91 para la secuencia peptídica TNYLTHR (SEQ ID NO.: 21), el ** representa que la asparagina se convirtió a ácido aspártico después de la truncación, mientras para el sitio N99T100 la secuencia peptídica QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK (SEQ ID NO.: 19), el * representa un alto nivel de escisión no específica por tripsina. Estos dos sitios de truncación se encontraron por formar impurezas de especies de LMW durante la evaluación de MT1 y MT5. La truncación en M245Y246 se encontró solamente en MT6 la cual tiene el enlazador único y es responsable para las impurezas de las especies de LMW2 durante la preparación de MT6.

Tabla 8-7.

Sitio	Secuencia Peptídica	MT1	MT5	MT6
N99T100	QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK* (SEQ ID NO.: 96)	12.6%	13.2%	13.6%

Sitio	Secuencia Peptídica	MT1	MT5	MT6
T90N91	TNYLTHR** (SEQ ID NO.: 97)	0.5%	0.1%	0.3%
M245Y246	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 98)	-	-	1.8%
M10Y11	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR (SEQ ID NO.: 99)	0.2%	1.5%	1.7%

Cuantificación de la ocupación de glicositos. La N-glicosilación es una PTM. La caracterización de la N-glicosilación específica del sitio que incluye macroheterogeneidad de N-glicano (ocupación del sitio de glicosilación) y microheterogeneidad (estructura de glicano específica del sitio) es importante para el entendimiento de la biosíntesis y función de la glicoproteína. La extensión de la glicosilación puede cambiar dependiendo de cómo es expresada la proteína. Los niveles de glicosilación en N36 fueron similares para todas las tres MiniTrampas del VEGF (**Tabla 8-8** y **Figura 51**). De manera similar, los niveles de glicosilación en N68 fueron también similares para todas las tres MiniTrampa del VEGF (**Tabla 8-8** y **Figura 52**). Los niveles de glicosilación en N123 también fueron similares para las tres MiniTrampas del VEGF (**Tabla 8-8** y **Figura 53**), pero la manosa-5 se encontró por ser elevada en la preparación MT1. Para los constructos de la MiniTrampa del VEGF, la glicosilación en Asn196 fue inferior para MT5 y MT6, comparada con MT1 (**Tabla 8-8** y **Figura 54**). Adicionalmente, la manosa-5 también fue elevada para la preparación MT1 que para las preparaciones MT5 y MT6.

Tabla 8-8.

Sitio	Péptido	MT1	MT5	MT6
N36	(R)VTSP**N**ITVTLK (SEQ ID NO.: 100)	98.3%	98.1%	99.4%
N68	(K)GFIIS**N**ATYK (SEQ ID NO.: 101)	51.9%	55.4%	64.9%
N123	(K)LVL**N**CTAR (SEQ ID NO.: 102)	99.9%	99.4%	98.4%
N196	(K)**N**STFVR (SEQ ID NO.: 103)	98.6%	44.5%	55.1%

Análisis de N-glicanos. La glicosilación en N36 se muestra en la **Tabla 8-9**. G2F, G2FS, G2FS2 fueron los N-glicanos mayores encontrados en todas las todas las tres MiniTrampas del VEGF. Para glicosilación en N68 mostrada en la **Tabla 8-10**, G2F y G2FS fueron los N-glicanos mayores encontrados en todas las tres MiniTrampas del VEGF. Para glicosilación en N123 mostrada en la **Tabla 8-11**, G2F y G2S fueron los N-glicanos mayores encontrados en todas las tres MiniTrampas

del VEGF y se detectó Manosa-5 a niveles altos en MT1 comparada con MT5 y MT6. Para glicosilación en N196 mostrada en la **Tabla 8-12**, G2, G2S, G2S2 fueron los N-glicanos mayores encontrados en todas las tres MiniTrampas del VEGF y se detectó Manosa a niveles altos en MT1 comparada con MT5 y MT6.

Tabla 8-9.

Glicanos en N36	MT1	MT5	MT6
G0F-GlcNAc	2.0%	1.8%	1.8%
G1F	3.2%	1.0%	1.4%
G1F-GlcNAc	4.8%	4.6%	4.9%
G1FS-GlcNAc	3.1%	3.8%	3.1%
G2F	17.4%	15.1%	19.8%
G2F2S	1.7%	2.0%	2.2%
G2FS	34.2%	31.5%	31.9%
G2FS2	20.4%	25.8%	19.0%
G3FS	2.3%	4.0%	5.5%
G3FS2	2.6%	4.7%	5.0%
G3FS3	1.1%	2.4%	1.9%
G1_Man5+Phos	1.2%	0.3%	0.2%
Man6+Phos	5.7%	2.5%	2.8%

Tabla 8-10.

Glicanos en N68	MT1	MT5	MT6
G0F-GlcNAc	1.2%	1.1%	1.1%
G1F	5.1%	1.4%	1.7%
G1F-GlcNAc	3.9%	3.9%	4.0%
G1FS	1.2%	0.4%	0.4%
G1FS1-GlcNAc	1.2%	1.6%	1.4%
G2F	27.4%	23.6%	28.6%
G2F2S	2.2%	3.0%	3.4%
G2FS	52.4%	55.2%	50.2%
G2FS2	3.9%	6.9%	5.8%
G3FS	0.5%	1.2%	1.6%
G3FS2	0.4%	1.1%	1.2%

Tabla 8-11.

Glicanos en N123	MT1	MT5	MT6
G0-GlcNAc	3.5%	3.7%	3.5%
G1-GlcNAc	6.2%	6.8%	6.4%
G1S-GlcNAc	4.1%	3.5%	2.8%
G2	10.6%	16.7%	17.1%
G2F	1.5%	7.2%	7.0%
G2FS	2.1%	13.6%	14.2%
G2S	12.7%	26.1%	25.5%
G2S2	1.3%	5.0%	6.6%
G1_Man4	3.8%	1.3%	1.4%
G1S_Man4	3.9%	2.1%	1.8%
G1_Man5	4.0%	1.2%	1.1%
G1S_Man5	3.2%	1.4%	1.4%
Man4	2.6%	1.9%	1.8%
Man5	35.5%	4.3%	3.1%
Man6	1.1%	0.1%	0.1%
Man7	2.8%	0.1%	0.1%

Tabla 8-12.

Glicanos en N196	MT1	MT5	MT6
G0-GlcNAc	1.9%	1.8%	1.9%
G1	4.1%	3.6%	4.2%
G1-GlcNAc	1.9%	2.5%	2.4%
G1S-GlcNAc	2.9%	2.6%	1.8%
G2	20.7%	28.2%	32.1%
G2F	2.0%	5.1%	6.0%
G2FS	2.0%	6.1%	6.2%
G2FS2	0.5%	1.6%	1.3%
G2S	17.7%	31.2%	29.9%
G2S2	4.4%	9.7%	6.7%
G3S	0.1%	0.7%	1.0%

Glicanos en N196	MT1	MT5	MT6
G1S_Man4	1.0%	0.3%	0.3%
G1_Man5	2.3%	0.5%	0.5%
Man3	3.1%	0.7%	0.6%
Man4	2.7%	0.8%	0.6%
Man5	30.4%	3.6%	3.4%

O-glicanos en el enlazador para MT6. El enlazador GS para MT6 se evaluó para estudiar O-glicanos en MT6. La O-xilosilación se encontró en residuos de serina localizados en el enlazador GS de MT6 (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGR, residuos de serina subrayados fueron glicosilados) (SEQ ID NO.: 98). La composición de los O-glicanos se muestra en la **Tabla 8-13**.

Tabla 8-13.

Composición	Masa	Anotación	Número	Nivel
Xilosilación	+132.0		Tri	<0.1%
			di	1.5%
			mono	15%
Xilosa + Galactosa	+294.1		mono	0.9%
Xilosa + Galactosa + Ácido Siálico	+585.2		mono	0.7%

Análisis de HILIC-FLR-MS. Se realizó análisis de HILIC-FLR-MS para todas las proteínas de la MiniTrampa del VEGF como se describe en la Sección 8.2. El análisis mostró que los glicanos N-ligados para MT5 y MT6 fueron similares, pero fueron diferentes que los obtenidos para MT1 (la **Figura 55** muestra los cromatogramas apilados y a escala completa, la **Figura 56** muestra los cromatogramas de sobre carga y a escala completa y la **Figura 57** muestra los cromatogramas a escala completa, apilados y normalizados.

Finalmente, el porcentaje de glicosilación e identificación detallada de glicano y cuantificación para todas las tres proteínas de la MiniTrampa del VEGF se listan en la **Tabla 8-14** y **Figura 58A-C**, respectivamente. Como se observa en todos los análisis de glicano, el perfil de glicosilación y niveles de manosa para MT5 y MT6 son similares, pero diferentes de MT1.

Tabla 8-14.

	MT1	MT5	MT6

% de Fucosilación	42.9%	57.8%	57.2%
% de Galactosilación	71.6%	92.9%	93.7%
% de Sialilación	33.1%	47.6%	44.8%
% de Alta Manosa	17.6%	2.6%	2.3%
% Bisectante	1.9%	0.4%	0.4%

Ejemplo 9. Producción y Cuantificación de Color Usando Optimización de proceso de Alimentación y Medio en Orientación Ascendente

(A) CDM No optimizado (Biorreactor de Control)

Se empleó la manufactura de la MiniTrampa descrita en el Ejemplo 5.

Los parámetros de operación para las etapas de estudio son como se conocen para uno de habilidad ordinaria en la técnica.

Medio en el día 0 = CDM1 e incluye los siguientes nutrientes, antioxidantes y metales:

- Se agregó cisteína a una concentración acumulativa 8-9 mM
- Los metales en el medio de partida se listan abajo a concentración 1x (donde las concentraciones son previas a la adición del inóculo):
  - Fe = 68-83 micromoles por litro de cultivo
  - Zn = 6-7 micromoles por litro de cultivo
  - Cu = 0.1-0.2 micromoles por litro de cultivo
  - Ni = 0.5-1 micromoles por litro de cultivo

En la recolección de MT1, se siguió el procedimiento de producción como se muestra en la **Figura 59**. Los parámetros de operación para la cromatografía se conocen por uno de habilidad ordinaria en la técnica. Los parámetros de operación para la afinidad de captura (etapa 3 de la **Figura 59**), afinidad de flujo continuo (etapa 5 de la **Figura 59**), AEX (etapa 8 de la **Figura 59**), y HIC (etapa 9 de la **Figura 59**) se resumen en la **Tabla 9-1**. La escisión proteolítica de aflibercept después de la etapa de filtración y afinidad de captura se llevó a cabo usando el procedimiento como se resume en el Ejemplo 1.2.

Tabla 9-1.

Etapas	**Afinidad de captura**	**Afinidad de flujo continuo**	**AEX**	**HIC**
Resina	MabSelect SuRe	MabSelect SuRe	POROS 50 HQ	Capto Fenil HS

Etapas	Afinidad de captura	Afinidad de flujo continuo	AEX	HIC
Carga	30 g/L de resina	30 g/L de resina pH 6.80 – 7.20	40 g/L de resina pH 8.30 – 8.50, 1.90 – 2.10 mS/cm	100 g/L de resina pH 4.40 – 4.60 7.50 – 10.50 mS/cm
Equilibrio	20 mM de fosfato de sodio pH 7.10 – 7.30, 2.60 – 3.20 mS/cm	26 mM de Tris, 16 mM de fosfato de sodio, 18 mM de acetato pH 6.90 – 7.10, 2.00 – 4.00 mS/cm	50 mM de Tris pH 8.30 – 8.50, 1.90 – 2.10 mS/cm	40 mM de Tris, 30 mM de citrato de sodio, 74 mM de acetato pH 4.40 – 4.60, 7.50 – 10.50 mS/cm
Lavado 1	10 mM de fosfato de sodio, 500 mM de NaCl pH 7.10 – 7.30, 40 – 50 mS/cm	26 mM de Tris, 16 mM de fosfato de sodio, 18 mM de acetato pH 6.90 – 7.10, 2.00 – 4.00 mS/cm	50 mM de Tris pH 8.30 – 8.50, 1.90 – 2.10 mS/cm	40 mM de Tris, 30 mM de citrato de sodio, 74 mM de acetato pH 4.40 – 4.60, 7.50 – 10.50 mS/cm
Lavado 2	20 mM de fosfato de sodio pH 7.10 – 7.30, 2.60 – 3.20 mS/cm	N/A	N/A	N/A
Elución	40 mM de ácido acético pH 2.80 – 3.20, 0.28 – 0.36 mS/cm	40 mM de ácido acético pH 2.80 – 3.20, 0.28 – 0.36 mS/cm	N/A	N/A

Etapas	Afinidad de captura	Afinidad de flujo continuo	AEX	HIC
Regeneración/ Extracción 1	500 mM de ácido acético, pH 2.25 – 2.65, 0.90 – 1.25 mS/cm	500 mM de ácido acético, pH 2.25 – 2.65, 0.90 – 1.25 mS/cm	2 M de cloruro de sodio (NaCl)	Amortiguador propietario
Regeneración/ Extracción 2	N/A	N/A	1 N de hidróxido de sodio (NaOH)	N/A

La **Tabla 9-2** muestra la cuantificación de color de las combinaciones obtenidas realizando varias etapas cromatográficas. La cuantificación de color se llevó a cabo usando muestras a partir de la combinación que tiene una concentración de proteína de 5 g/L.

La combinación de afinidad de captura se refiere a lo eluido recolectado realizando la etapa de afinidad de captura (etapa 3 de la **Figura 59**). La combinación enzimática se refiere al flujo continuo, recolectado realizando la etapa de escisión enzimática (etapa 4 de la **Figura 59**). La combinación de afinidad de flujo continuo se refiere al flujo continuo, recolectado realizando la etapa de afinidad de flujo continuo (etapa 5 de la **Figura 59**) y el eluado de afinidad de flujo continuo se refiere a lo eluido recolectado realizando la etapa de afinidad de flujo continuo (etapa 5 de la **Figura 59**). La combinación de AEX y extracción de AEX se refieren a las fracciones de flujo continuo y extraídas obtenidas realizando la etapa de cromatografía de intercambio aniónico (etapa 8 de la **Figura 59**). La combinación de HIC se refiere al flujo continuo, recolectado realizando la etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica (etapa 9 de la **Figura 59**).

Cada etapa como se observa en la **Tabla 9-2** muestra una reducción en la coloración (como se observa a partir de la reducción en los valores b* de las combinaciones). Por ejemplo, realizando cromatografía de afinidad de flujo continuo, la fracción de flujo continuo tiene un valor b* de 2.16 (reducido a partir de un valor b* de 2.52 para el flujo continuo, recolectado a partir de la etapa de afinidad de captura). El flujo continuo y lavado después de la separación de AEX reduce además la coloración, como se observa por reducción en el valor b* de 2.16 a 0.74. Como se esperaba, la extracción de la columna de AEX conduce a una muestra con un color amarillo-marrón el cual fue significantemente más intenso que la coloración a partir del flujo continuo y lavado después de la separación de AEX como se observa a partir de los valores b* (8.10 contra 0.74). Finalmente, una etapa de HIC proporciona una reducción adicional en el color (el valor b* puede ser normalizado

para la concentración de proteína de 5 g/L a partir del valor b* obtenido para la combinación de HIC a 28.5 g/L de concentración de proteína).

Tabla 9-2. Cuantificación de Color de Muestras en Varias Etapas de Producción

Muestra	Conc. (g/L)	L*	a*	b*
Combinación Afinidad de Captura	5.0 ± 0.1	98.75	-0.12	2.52
Combinación de Escisión Enzimática	5.0 ± 0.1	99.03	-0.07	1.61
Combinación de Afinidad de flujo completo	5.0 ± 0.1	98.95	-0.08	2.16
Eluado de afinidad de flujo completo	5.0 ± 0.1	98.92	-0.01	0.83
Combinación de AEX	5.0 ± 0.1	99.72	-0.03	0.74
Extracción de AEX con NaCl 2M	5.0 ± 0.1	96.25	-0.42	8.10
Combinación de HIC	28.5	98.78	-0.28	3.11

(B) CDM optimizada (Cisteína Baja, Metales Bajos y Biorreactor Antioxidantes Incrementados)

Se evaluó el efecto de reducir la concentración de cisteína, reducir la concentración de metales, e incrementar antioxidantes en la coloración usando los siguientes protocolos:

Medio en el día 0 = CDM1

- Se agregó cisteína a una concentración acumulativa 5-6 mM
- Se agregaron antioxidantes a CDM1 para alcanzar las siguientes concentraciones acumulativas (donde las concentraciones son previas a la adición del inóculo):
  - Taurina = 10 mM de cultivo
  - Glicina = 10 mM de cultivo
  - Ácido tióctico = 0.0024 mM de cultivo
  - Vitamina C (ácido ascórbico) = 0.028 mM de cultivo
- Los metales en el medio de partida son listados abajo para el nivel 1x.
  - Fe = 68-83 micromoles por litro de cultivo
  - Zn = 6-7 micromoles por litro de cultivo
  - Cu = 0.1-0.2 micromoles por litro de cultivo
  - Ni = 0.5-1 micromoles por litro de cultivo.
  - La reducción de todos los metales incluidos usa 0.25x las concentraciones indicadas anteriormente para el medio.

Después de la recolección de la muestra de MT1, se siguió el procedimiento de producción como se muestra en la **Figura 59**. Los parámetros de operación para la cromatografía se conocen por uno de habilidad ordinaria en la técnica. Los parámetros de operación para la afinidad de captura,

afinidad de flujo continuo, y HIC se resumen en la **Tabla 9-1**. La escisión proteolítica de aflibercept después de la etapa de filtración y afinidad de captura se llevó a cabo usando el procedimiento como se resumen en el Ejemplo 1.2.

La Tabla **9-3** muestra la cuantificación de color de las combinaciones obtenidas realizando las varias etapas cromatográficas. La cuantificación de color se llevó a cabo usando muestras a partir de la combinación que tiene una concentración de proteína de 5 g/L. Las etapas como se observa en la **Tabla 9-3** proporcionó una producción similar como se observa para las etapas en la **Tabla 9-2**.

Tabla 9-3. Cuantificación de color de muestras en varias etapas de producción de la MiniTrampa

Muestra	**Conc. (g/L)**	**L***	**a***	**b***
Cpmb	5.0 ± 0.1	99.18	-0.09	1.77
Combinación de escisión enzimática	5.0 ± 0.1	99.44	-0.06	1.17
Combinación de afinidad de flujo continuo	5.0 ± 0.1	99.32	-0.10	1.58
Eluado de afinidad de flujo continuo	5.0 ± 0.1	99.74	-0.05	0.60
Combinación de AEX	5.0 ± 0.1	99.63	-0.07	0.50
Extracción de AEX con NaCl 2 M	5.0 ± 0.1	97.63	-0.49	6.10
Combinación de HIC	27.6	99.07	-0.29	2.32

Comparando la **Tabla 9-2** y **Tabla 9-3**, es evidente que la “Cisteína Baja, Metales Bajos y Condición de Biorreactor de Antioxidantes Incrementada”, tiene color inferior en la combinación de afinidad de captura (valor b* de 1.77) comparada con la “Condición de Biorreactor de Control” (valor b* 2.52).

Se formó una muestra MT a una concentración de 160 g/L, donde la MT se formó usando las etapas listadas en la **Tabla 9-2** y **Tabla 9-3**, se predice por tener un valor b* de 13.45 para la “Cisteína Baja, Metales Bajos, y Condición de Biorreactor de Antioxidantes Incrementada”, y un valor b* de 17.45 para la “Condición de Biorreactor de Control”. Una reducción del 23% en color se logró a través de la optimización del medio en orientación ascendente y alimentaciones. De manera similar, una muestra de MT con una concentración de 110 g/L, donde la MT se formó usando las etapas listadas en la **Tabla 9-2** y **Tabla 9-3**, se predice por tener un valor b* de 9.25 para la “Cisteína Baja, Metales Bajos, y Condición de Biorreactor de Antioxidantes Incrementada”, y un valor b* de 12 para la “Condición de Biorreactor de Control”.

Para entender cómo cada operación de unidad de producción contribuye a la reducción de color, se calculó el valor b* para cada intermediario del proceso de producción como un porcentaje del color de la combinación de afinidad de captura (**Tabla 9-4**).

Tabla 9-4.

	Muestra	Conc. (g/L)	b*	Δb*	b* como % de combinación de afinidad de captura
Biorreactor de control	Combinación de afinidad de captura	5.0 ± 0.1	2.52	N/A	100.0
	Combinación de escisión enzimática	5.0 ± 0.1	1.61	-0.91	63.8
	Combinación de afinidad de flujo continuo	5.0 ± 0.1	2.16	0.55	85.7
	Combinación de AEX	5.0 ± 0.1	0.74	-1.42	29.4
	Combinación de HIC	5.0 ± 0.1	0.55	-0.19	21.8
Cisteína Baja, Metales Bajos, y Biorreactor de Antioxidantes Incrementado	Combinación de afinidad de captura	5.0 ± 0.1	1.77	N/A	100.0
	Combinación de escisión enzimática	5.0 ± 0.1	1.17	-0.60	66.1
	Combinación de afinidad de flujo completo	5.0 ± 0.1	1.58	0.41	89.2
	Combinación de AEX	5.0 ± 0.1	0.50	-1.08	28.2
	Combinación de HIC	5.0 ± 0.1	0.42	-0.08	23.7

La operación de la unidad de AEX proporciona la mayor reducción de color (cambio 1.08 a 1.42 en b*) mientras la operación de unidad HIC proporciona alguna reducción de color adicional (cambio 0.08 a 0.19 en b*). Las operaciones de unidad evaluaron la remoción total de 76.3% – 78.2% del color presente en la combinación de afinidad de captura.

El color de varios intermediarios del proceso de producción para “Condición de Biorreactor de Control”, y “Cisteína Baja, Metales Bajos, y Condición de Biorreactor de Antioxidantes Incrementados”, también se estudiaron para el porcentaje de 2-oxo-histidinas y porcentaje de oxo-triptofanos en los oligopéptidos que se generaron por digestión de proteasa, como se mide por espectrometría de masas como se muestra en la **Tabla 9-5** y **Tabla 9-6**, respectivamente. El mapeo peptídico se realizó como se discute en el Ejemplo 3.

Con referencia a la **Tabla 9-5**, comparando los niveles de oxidación de histidina en las combinaciones en diferentes etapas de producción, es evidente que la abundancia relativa de los

niveles del porcentaje de oxidación de histidina para MT formado se reduce en la combinación conforme el proceso de producción progresa. Por ejemplo, para H209 en la “Condición de Biorreactor de Control”, el porcentaje del nivel de oxidación de histidina fue 0.062 para la combinación de escisión enzimática y esta se redujo a 0.029 para AEX de flujo completo y además se redujo a 0.020 para la combinación de HIC. De manera similar, para H209 en la “Baja Cisteína, Metales Bajos, y Condición de Biorreactor de Antioxidantes Incrementados”, el porcentaje del nivel de oxidación de histidina fue 0.039 para la combinación de escisión enzimática y esta se redujo a 0.023 para AEX de flujo continuo y además se redujo a 0.016 para la combinación de HIC. De este modo, la estrategia de producción conduce a una reducción en el porcentaje de los niveles de oxidación de histidina en MT. Como la coloración se reduce, también se reduce la presencia de algunos de los residuos oxidados en la muestra. Similar a la oxidación de histidina, los niveles de oxidación de triptofano también se rastrearon para las combinaciones en diferentes etapas de producción para tanto la “Condición de Biorreactor de Control” y “Cisteína Baja, Metales Bajos, y Condición de Biorreactor de Antioxidantes Incrementados” **(Tabla 9-6).**

Tabla 9-5.

	Fracción	**Color (b*)**	**Niveles de oxidación de histidina (%)**					
			H19 (+14)	**H86 (+14)**	**H95 (+14)**	**H110 (+14)**	**H145 (+14)**	**H209 (+14)**
Condición de Biorreactor de Control	Combinación de Escisión Enzimática	1.61	0.023	0.018	0.011	0.014	0.007	0.062
	Combinación de afinidad de flujo continuo (carga de AEX)	2.16	0.030	0.027	0.018	0.015	0.011	0.067
	Elución de afinidad de flujo continuo	0.83	0.030	0.022	0.000	0.018	0.004	0.046
	AEX de flujo continuo	0.74	0.026	0.025	0.013	0.016	0.010	0.029

	Fracción	Color (b*)	Niveles de oxidación de histidina (%)					
			H19 (+14)	H86 (+14)	H95 (+14)	H110 (+14)	H145 (+14)	H209 (+14)
	Extracción de AEX con NaCl 2M	8.10	0.024	0.063	0.033	0.019	0.012	0.063
	Combinación de HIC	0.55	0.018	0.009	0.002	0.021	0.005	0.020
Cisteína Baja, Metales Bajos y Condición de Biorreactor de Antioxidantes Incrementados	Combinación de escisión enzimática	1.17	0.019	0.017	0.009	0.014	0.008	0.039
	Combinación de afinidad de flujo continuo (carga de AEX)	1.58	0.026	0.025	0.013	0.014	0.010	0.043
	Elución de afinidad de flujo continuo	0.60	0.031	0.017	0.007	0.020	0.003	0.016
	AEX de flujo continuo	0.50	0.020	0.022	0.009	0.014	0.010	0.023
	Extracción de AEX con NaCl 2M	6.10	0.020	0.055	0.025	0.016	0.011	0.042
	Combinación de HIC	0.42	0.013	0.009	0.002	0.017	0.003	0.016

Tabla 9-6.

	Fracción	Color (b*)	Niveles de oxidación de triptofano (%)						
			W58 (+4)	W58 (+16)	W58 (+32)	W58 (+48)	W138 (+4)	W138 (+16)	W138 (+32)
Condición de Biorreactor de Control	Combinación de escisión enzimática	1.61	0.006	0.032	0.289	0.000	0.020	1.093	0.106
	Combinación de afinidad de flujo continuo (carga de AEX)	2.16	0.016	0.055	0.327	0.000	0.017	0.771	0.111
	Elución de afinidad de flujo continuo	0.83	0.009	0.031	0.453	0.000	0.025	1.039	0.132
	AEX de flujo continuo	0.74	0.014	0.038	0.283	0.000	0.023	0.720	0.120
	Extracción de AEX con NaCl 2M	8.10	0.043	0.089	0.462	0.000	0.031	0.620	0.175
	Combinación de HIC	0.55	0.037	0.126	0.413	0.000	0.020	0.656	0.274
Cisteína Baja, Metales Bajos y Condición de Bio-reactor de Antioxi-dantes Incremen-	Combinación de escisión enzimática	1.17	0.009	0.027	0.239	0.001	0.027	1.026	0.136
	Combinación de afinidad de flujo continuo (carga de AEX)	1.58	0.013	0.045	0.284	0.000	0.021	0.628	0.107
	Elución de afinidad de flujo continuo	0.60	0.003	0.026	0.421	0.021	0.025	1.032	0.132

	Fracción	Color (b*)	Niveles de oxidación de triptofano (%)						
			W58 (+4)	**W58 (+16)**	**W58 (+32)**	**W58 (+48)**	**W138 (+4)**	**W138 (+16)**	**W138 (+32)**
tados	AEX de flujo continuo	0.50	0.011	0.031	0.235	0.000	0.022	0.676	0.102
	Extracción de AEX con NaCl 2M	6.10	0.034	0.073	0.478	0.000	0.032	0.635	0.169
	Combinación de HIC	0.42	0.029	0.122	0.355	0.000	0.022	0.800	0.236

Ejemplos Numerados

Los ejemplos numerados ejemplares proporcionados abajo no están propuestos para ser limitantes y podría entenderse, con base en la descripción de la presente como se aprecia por aquellos expertos en la técnica, que variaciones adicionales para producir composiciones anti-VEGF, que incluyen aflibercept y MiniTrampa del VEGF, usando CDM y condiciones modificantes para reducir o aumentar las variantes de proteína y el color amarillo-marrón, pueden ser implementadas consistentes con la descripción de la presente.

1. Un método para producir anti-VEGF que tiene una cantidad reducida de variantes anti-VEGF expresadas en una célula hospedera cultivada en un medio químicamente definido (CDM), que comprende:

(a) proporcionar tal célula hospedera diseñada por ingeniería genética para expresar anti-VEGF;

(b) cultivar tal célula hospedera en tal CDM bajo condiciones adecuadas en las cuales tal célula hospedera expresa anti-VEGF para producir una muestra anti-VEGF;

(c) recolectar la proteína producida por tal célula hospedera, en donde un valor objetivo de variantes anti-VEGF es como sigue:

i. tal valor objetivo de variantes se obtiene usando tal CDM en donde la concentración acumulativa de hierro en tal CDM es menos de, o igual a aproximadamente 55.0 µM;

ii. tal valor objetivo de variantes se obtiene usando tal CDM en donde la concentración acumulativa de cobre en tal CDM es menos de, o igual a aproximadamente 0.8 µM;

iii. tal valor objetivo de variantes se obtiene usando tal CDM en donde la concentración acumulativa

de níquel en tal CDM es menos de, o igual a aproximadamente 0.4 µM;

iv. tal valor objetivo de variantes se obtiene usando tal CDM en donde la concentración acumulativa de zinc en tal CDM es menos de, o igual a aproximadamente 56.0 µM;

v. tal valor objetivo de variantes se obtiene usando tal CDM en donde la concentración acumulativa de cisteína en tal CDM es menos de, o igual a aproximadamente 10.0 mM; y/o

vi. tal valor objetivo de variantes se obtiene agregando una concentración acumulativa de un antioxidante en el CDM a aproximadamente 0.001 mM hasta aproximadamente 10 mM para cualquier antioxidante único y no más de aproximadamente 30 mM de antioxidantes totales donde antioxidantes múltiples son agregados.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde tal valor objetivo de variantes son proteínas que comprenden menos de aproximadamente 20% variantes anti-VEGF.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde tal concentración acumulativa de hierro en tal CDM es menos de, o igual a aproximadamente 55.0 µM.

4. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde tal concentración acumulativa de cobre en tal CDM es menos de, o igual a aproximadamente 0.8 µM.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde tal concentración acumulativa de níquel en tal CDM es menos de, o igual a aproximadamente 0.4 µM.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde tal concentración acumulativa de zinc en tal CDM es menos de, o igual a aproximadamente 56.0 µM.

7. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde tal concentración acumulativa de cisteína en tal CDM es menos de, o igual a aproximadamente 10.0 mM.

8. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde tal concentración acumulativa de un antioxidante en el CDM a aproximadamente 0.001 mM hasta aproximadamente 10 mM para cualquier antioxidante único y no más de aproximadamente 30 mM de antioxidantes totales donde antioxidantes múltiples son agregados.

9. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde tal célula hospedera se selecciona a partir de un grupo que consiste en CHO, NS0, Sp2/0, células renales embriónica y BHK.

10. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde tal recolección clarificada comprende uno o más variantes anti-VEGF, en donde tales variantes tienen al menos un residuo de aminoácido oxidado.

11. El método de conformidad con la reivindicación 10, en donde tal residuo de aminoácido oxidado se selecciona a partir del grupo que consiste en metionina, triptofano, histidina, fenilalanina, tirosina y una combinación de las mismas.

12. El método de conformidad con la reivindicación 11, en donde tal residuo de aminoácido

oxidado es histidina.

13. El método de conformidad con la reivindicación 11, en donde tal residuo de aminoácido oxidado es triptofano.

14. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde tal variante anti-VEGF comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consiste en: SEQ ID NO.: 17, SEQ ID NO.: 18, SEQ ID NO.: 19, SEQ ID NO.: 20, SEQ ID NO.: 21, SEQ ID NO.: 22, SEQ ID NO.: 23, SEQ ID NO.: 62, SEQ ID NO.: 63, SEQ ID NO.: 64, SEQ ID NO.: 65, SEQ ID NO.: 66, SEQ ID NO.: 67, SEQ ID NO.: 68, SEQ ID NO.: 69, SEQ ID NO.: 70, SEQ ID NO.: 71 y combinaciones de las mismas.

15. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde tal antioxidante es taurina, hipotaurina, glicina, ácido tióctico, glutationa, colina, hidrocortisona, Vitamina C, Vitamina E o combinaciones de los mismos.

16. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde tal muestra anti-VEGF de (b) tiene un color amarillo-marrón, en donde tal color Es caracterizado en el espacio de color L*, a*, b*, de CIE, donde L* es aproximadamente 70 hasta aproximadamente 99, a* es aproximadamente 0 y b* es aproximadamente 20 o menos cuando la concentración de anti-VEGF es normalizados a 5.0 g/L.

17. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde tal color amarillo-marrón de (b) es caracterizado como sigue:

a. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY2;

b. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY3;

c. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY4;

d. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY5;

e. entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY3; o

f. entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY4,

en donde la concentración de proteína de anti-VEGF a partir de la recolección clarificada es normalizada a 5.0 g/L.

18. Un método para producir MiniTrampa recolectada a partir de una célula hospedera cultivada en un medio químicamente definido (CDM), que comprende:

(a) proporcionar una célula hospedera diseñada por ingeniería genética para expresar aflibercept;

(b) cultivar tal célula hospedera en tal CDM bajo condiciones adecuadas en las cuales tal célula hospedera expresa tal aflibercept; y

(c) recolectar aflibercept producido por tal célula hospedera,

(d) unir aflibercept a partir de tal recolección clarificada a una primera cromatografía de captura; y

(e) eluir tal aflibercept de la etapa (d) y someter tal aflibercept a escisión enzimática para remover su dominio Fc formando de este modo MiniTrampa, en donde el color de tal elución es caracterizado como sigue:

a. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY2;

b. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY3;

c. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY4;

d. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY5;

e. entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY3;

f. entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY4; y

en donde, en el espacio de color L*, a*, b*, de CIE, L* es aproximadamente 70 hasta aproximadamente 99, a* es aproximadamente 0 y b* es aproximadamente 20 o menos y la concentración de aflibercept es normalizada a 5.0 g/L.

19. El método de conformidad con la reivindicación 18, en donde tal recolección que tiene un cierto valor BY objetivo se obtiene usando tal CDM bajo las siguientes condiciones:

i. la concentración acumulativa de hierro en tal CDM a menos de o igual a aproximadamente 55.0 µM;

ii. la concentración acumulativa de cobre en tal CDM a menos de o igual a aproximadamente 0.8 µM;

iii. la concentración acumulativa de níquel en tal CDM a menos de o igual a aproximadamente 0.4 µM;

iv. la concentración acumulativa de zinc en tal CDM a menos de o igual a aproximadamente 56.0 µM;

v. la concentración acumulativa de cisteína en tal CDM a menos de 10.0 mM; y/o

vi. tal CDM incluye antioxidantes donde la concentración acumulativa de un antioxidante es aproximadamente 0.001 mM hasta aproximadamente 10.0 mM para cualquier antioxidante único.

20. El método de conformidad con la reivindicación 19, en donde tal antioxidante es taurina, hipotaurina, glicina, ácido tióctico, glutationa, colina, hidrocortisona, Vitamina C, Vitamina E o combinaciones de los mismos.

21. El método de conformidad con la reivindicación 19, en donde tal concentración acumulativa de un antioxidante en tal CDM es aproximadamente 0.001 mM hasta aproximadamente 10.0 mM para cualquier antioxidante único y la concentración acumulativa de todos los antioxidantes es no más de aproximadamente 30.0 mM.

22. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 19, en donde la reducción de la concentración de metal en tal CDM a 0.5x reduce el color con aumento en el titulador comparado con MiniTrampa cultivada en tal CDM donde la concentración de metal no se reduce.

23. Un método para incrementar la producción de MiniTrampa recolectada a partir de una célula hospedera cultivada en un medio químicamente definido (CDM) y reducir la muestra de color de MiniTrampa, que comprende:

(a) proporcionar tal célula hospedera diseñada por ingeniería genética para expresar aflibercept;

(b) cultivar tal célula hospedera en tal CDM bajo condiciones adecuadas en las cuales tal célula hospedera expresa aflibercept en donde:

i. la concentración acumulativa de hierro en tal CDM a menos de o igual a aproximadamente 55.0 µM;

ii. la concentración acumulativa de cobre en tal CDM a menos de o igual a aproximadamente 0.8 µM;

iii. la concentración acumulativa de níquel en tal CDM a menos de o igual a aproximadamente 0.4 µM;

iv. la concentración acumulativa de zinc en tal CDM a menos de o igual a aproximadamente 56 µM;

v. la concentración acumulativa de cisteína en tal CDM a menos de 10 mM; y/o

vi. que incluye uno o más antioxidantes en tal CDM en una concentración de aproximadamente 0.001 mM hasta aproximadamente 10.0 mM para cualquier antioxidante único;

(c) recolectar aflibercept producido por tal célula hospedera para formar una recolección que comprende aflibercept

(d) unir aflibercept a partir de tal recolección clarificada a una primera cromatografía de captura;

(e) eluir tal aflibercept de la etapa (d) y someter tal aflibercept a escisión enzimática para remover su dominio Fc formando de este modo MiniTrampa.

24. El método de conformidad con la reivindicación 23, en donde tal titulador se incrementa mientras tal color de la muestra no incrementa cuando la concentración de proteína en tal recolección es normalizada a 5.0 g/L.

25. El método de conformidad con la reivindicación 23, en donde tal concentración acumulativa de antioxidantes en tal CDM es aproximadamente 0.001 mM hasta aproximadamente 10.0 mM para cualquier antioxidante único y la concentración acumulativa de todos los antioxidantes es no más de aproximadamente 30.0 mM.

26. El método de conformidad con la reivindicación 24, en donde tal valor BY del color de la muestra es mayor de aproximadamente BY3 cuando la concentración de proteína en tal recolección es normalizada a 5.0 g/L.

27. El método de conformidad con la reivindicación 23, en donde tal color de la muestra tiene un valor b* que se reduce por aproximadamente 45% comparada con MiniTrampa cultivada en tal CDM donde la concentración de (i) a (vi) no se mantiene.

28. El método de conformidad con la reivindicación 23, en donde tal antioxidante es taurino, hipotaurina, glicina, ácido tióctico, glutationa, colina, hidrocortisona, Vitamina C, Vitamina E o combinaciones de los mismos.

29. El método de conformidad con la reivindicación 23, en donde tal CDM incluye uridina, manganeso, galactosa o combinaciones de los mismos.

30. El método de conformidad con la reivindicación 23, en donde existe mínimo impacto al titulador, concentración de células viables, viabilidad, amoníaco u osmolalidad.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2022/0000660
Recibo: 23-149194
Fecha: 09/02/2023

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 791339
CUS: 1909505325

Patente PCT
COMPOSICIONES DE PROTEÍNA ANTI-VEGF Y MÉTODOS PARA PRODUCIR LA MISMA

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	$ 196,000	$ 196,000
		TOTAL			$ 196,000

Sede Centro: Carrera 13 No.27-00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá D.C. - Colombia
Web: www.sic.gov.co e-mail:contactenos@sic.gov.co Conmutador:(571)5870000 Contact Center: (571)5920400