

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 398**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2010 E 15189425 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3037104**

54 Título: **Aislamiento y purificación de anticuerpos anti-IL-13 usando cromatografía de afinidad a Proteína A**

30 Prioridad:

20.10.2009 US 253411 P

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

23.03.2021

73 Titular/es:

**ABBVIE INC. (100.0%)
1 North Waukegan Road
North Chicago, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

HICKMAN, ROBERT

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 813 398 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aislamiento y purificación de anticuerpos anti-IL-13 usando cromatografía de afinidad a Proteína A

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud reivindica el beneficio del documento de Solicitud Provisional de Estados Unidos con n.º de serie 61/253.411, presentado el 20 de octubre de 2009.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

IL-13 humana es una glicoproteína de 17 kDa clonada a partir de linfocitos T activados y producida por linfocitos T activados del linaje Th2, linfocitos T CD4+ Th0 y Th1, linfocitos T CD8+ y varias poblaciones de células que no son linfocitos T, tales como mastocitos (Zurawski y de Vries, 1994 *Immunol Today*, 15, 19-26). IL-13 promueve el intercambio de isotipo de inmunoglobulina a IgE en linfocitos B humanos (Punnonen, Aversa *et al.* 1993 *Proc Natl Acad Sci USA* 90 3730-4) y suprime la producción de citoquinas inflamatorias tanto en seres humanos como en ratones (de Waal Malefyt *et al.*, 1993, *J Immunol*, 151, 6370-81; Doherty *et al.*, 1993, *J Immunol*, 151, 7151-60). IL-13 se une a sus receptores de superficie celular, IL-13R α 1 e IL-13R α 2. IL-13R α 1 interactúa con IL-13 con baja afinidad (KD ~ 10 nM), seguido de reclutamiento de IL-4R para formar el complejo receptor heterodímero de señalización de alta afinidad (KD ~ 0,4 nM) (Aman *et al.*, 1996, *J Biol Chem*, 271, 29265-70; Hilton *et al.*, 1996, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93,497-501). El complejo IL-4R/IL-13R α 1 se expresa en numerosos tipos de células tales como linfocitos B, monocitos/macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales de las vías respiratorias, y células musculares lisas de las vías respiratorias (Graber *et al.*, 1998, *Eur J Immunol*, 28, 4286-98; Murata *et al.*, 1998, *Int Immunol*, 10, 1103-10; Akaiwa *et al.*, 2001, *Cytokine*, 13, 75-84). El ligamiento del complejo receptor IL-13R α 1/IL-4R da como resultado la activación de una diversidad de rutas de transducción de señales incluyendo las rutas del transductor y activador de la señal de transcripción (STAT6) y del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2) (Wang *et al.*, 1995, *Blood*, 864218-27; Takeda *et al.*, 1996, *J Immunol*, 157,3220-2). La cadena de IL-13R α 2 por sí sola tiene alta afinidad (KD ~ 0,25-0,4 nM) por IL-13, y funciona tanto como receptor señuelo que regula negativamente la unión de IL-13 (Donaldson *et al.*, 1998, *J Immunol*, 161, 2317-24) como receptor de señalización que induce síntesis de TGF- β y fibrosis a través de la ruta de AP-1 en macrófagos y posiblemente otros tipos de células (Fichtner-Feigl, Strober *et al.* 2006 *Nat Med* 12 99-106).

Varios estudios realizados en modelos preclínicos de asma en animales indican que IL-13 desempeña un importante papel en el asma. Estos datos incluyen resistencia al asma en ratones con inactivación génica de IL-13 así como inhibición del fenotipo de asma con antagonistas de IL-13 (receptores solubles de IL-13, mAbs anti-IL-13, etc.) en diversos modelos en ratón (Wills-Karp y Chiaramonte, 2003, *Curr Opin Pulm Med*, 9 21-7; Wills-Karp, 2004, *Immunol Rev*, 202 175-90). Múltiples estudios han demostrado que la administración farmacológica de IL-13 recombinante a los pulmones de ratones así como de cobayas induce hipersecreción de mucosidad en las vías respiratorias, eosinofilia e hiperreactividad de las vías respiratorias ("AHR"; Grunig *et al.*, 1998, *Science*, 282, 2261-3; Wills-Karp *et al.*, 1998, *Science*, 282, 2258-61; Kibe *et al.*, 2003, *Am J Respir Crit Care Med*, 167,50-6; Vargaftig y Singer, 2003, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284, L260-9; Vargaftig y Singer, 2003, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 28, 410-9). Estos efectos de IL-13 se reproducen en sistemas transgénicos en ratones con expresión constitutiva o inducible de IL-13 (Zhu *et al.*, 1999, *J Clin Invest*, 103, 779-88; Zhu *et al.*, 2001, *Am J Respir Crit Care Med*, 164, S67-70; Lanone *et al.*, 2002, *J Clin Invest*, 110463-74). La sobreexpresión transgénica crónica de IL-13 también induce fibrosis subepitelial y enfisema. Los ratones deficientes en la molécula de señalización de IL-13 (e IL-4) STAT6 fracasan a la hora de desarrollar AHR inducida por alérgeno y sobreproducción de mucosidad (Kuperman *et al.*, 2002, *Nat Med*, 8,885-9). Estudios que usan una proteína de fusión receptora de IL-13 soluble (sIL-13R α 2Fc) han demostrado el papel principal de esta citoquina en enfermedad experimental de las vías aéreas inducida por el alérgeno ovoalbúmina (OVA) (Grunig *et al.*, 1998, *Science*, 282,2261-3; Wills-Karp *et al.*, 1998, *Science*, 282,2258-61; Taube *et al.*, 2002, *J Immunol*, 169, 6482-9). La eficacia de un tratamiento con anti-IL-13 también se ha demostrado en un modelo crónico de asma murina. Además de exhibir los rasgos de hipersecreción de mucosidad y AHR, este modelo de asma crónica muestra varias características distintivas de la enfermedad humana de las que carecen los modelos más agudos. Estas incluyen eosinofilia del tejido pulmonar situado en los espacios interepiteliales así como fibrosis del músculo liso medida mediante el aumento en la deposición de colágeno. El modelo de asma crónica se induce mediante provocaciones en aerosol repetidas con OVA en ratones sensibilizados con OVA una vez por semana durante un total de 4 semanas. El anticuerpo anti-IL-13 administrado durante las 2 últimas semanas de las provocaciones con OVA (desde el día 36 con lecturas de eficacia evaluadas en el día 53 de estudio) inhibió significativamente AHR, inflamación pulmonar, hiperplasia de células calciformes, hipersecreción de mucosidad, y fibrosis de las vías respiratorias (Yang *et al.*, 2005, *J Pharmacol Exp Ther*, 313, 8-15). IL-13 está implicada en la patogénesis de asma humana dado que se han detectado niveles elevados de ARNm de IL-13 y proteína en los pulmones de pacientes asmáticos, que correlaciona con la gravedad de la enfermedad (Huang *et al.*, 1995, *J Immunol*, 155, 2688-94). Además, se han identificado polimorfismos genéticos de IL-3 humanos, que conducen a niveles elevados de IL-13 y están asociados con asma y atopía (Heinzmann *et al.*, 2000, *Hum Mol Genet*, 9, 549-59; Hoerauf *et al.*, 2002, *Microbes Infect*, 4,37-42; Vercelli, 2002, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2,389-93; Heinzmann *et al.*, 2003, *J Allergy Clin Immunol*, 112, 735-9; Chen *et al.*, 2004, *J Allergy Clin Immunol*, 114, 553-60; Vladich *et al.*, 2005, *J Clin Invest*, 115, 747-54), y se han detectado niveles elevados de IL-13 en los pulmones de pacientes con

asma (Huang *et al.*, 1995, J Immunol, 155, 2688-94; Arima *et al.*, 2002, J Allergy Clin Immunol, 109, 980-7; Berry *et al.*, 2004, J Allergy Clin Immunol, 114, 1106-9). También se ha demostrado un vínculo genético entre IL-13 y asma puesto que los individuos con un polimorfismo en el gen de IL-13 que causa mayores niveles plasmáticos de IL-13 presentan un aumento de riesgo de atopía y asma (Wills-Karp, 2000, Respir Res, 1, 19-23).

Debido al papel de la IL-13 humana en una diversidad de trastornos humanos, se han diseñado estrategias terapéuticas para inhibir o contrarrestar la actividad de IL-13. En particular, se han buscado anticuerpos que se unan a, y neutralicen, IL-13 como medio para inhibir la actividad de IL-13.

Por ejemplo, Yang *et al.*, 2005., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 313, 8-15 usa un anticuerpo monoclonal anti-IL-13 de neutralización en un modelo crónico de asma persistente en ratón. Sin embargo, existe la necesidad en la técnica de métodos mejorados de producción y purificación de tales anticuerpos para uso farmacéutico. La presente invención aborda esta necesidad.

SUMARIO DE LA INVENCION

Basándose en la divulgación que está contenida en el presente documento, la invención proporciona un método para producir una preparación de anticuerpo anti-IL-13 reducida en proteínas de célula hospedadora (reducida en HCP) a partir de una mezcla de muestra que comprende un anticuerpo anti-IL-13 y al menos una HCP, comprendiendo dicho método:

(a) filtrar dicha mezcla de muestra con un filtro de filtración en lecho profundo y recoger una mezcla de muestra filtrada en lecho profundo;

(b) poner en contacto dicha mezcla de muestra filtrada en lecho profundo con una resina de cromatografía de afinidad a Proteína A, lavar dicha resina de cromatografía de afinidad con un tampón que comprende Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,2, seguido de un lavado con un tampón que comprende citrato sódico/ácido cítrico 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 6, y a continuación con un tampón que comprende Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,2, y recoger una muestra de cromatografía de afinidad;

(c) someter dicha muestra de cromatografía de afinidad a una reducción de pH para formar de ese modo una muestra de pH reducido, en el que dicha muestra de pH reducido tiene un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 4;

(d) ajustar el pH de dicha muestra de pH reducido a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8,5 y poner en contacto dicha muestra de pH ajustado con una resina de intercambio aniónico que comprende un sustituyente aniónico aminoetilo cuaternario (QAE) y recoger una muestra de intercambio iónico; y

(e) poner en contacto dicha muestra de intercambio iónico con un material de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y recoger una muestra de HIC, en el que dicha muestra de HIC comprende dicha preparación de anticuerpo reducida en HCP,

en el que aproximadamente se refiere a un 20 % mayor o menor que el valor de referencia,

y en el que dicho anticuerpo anti-IL-13 es un anticuerpo IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₄, o IgM humanizado que comprende una región variable de cadena pesada de EVTLRESGPGLVKPTQLTLTCTLYGFSLSSTDMGVDWIRQPPGKLEWLAIHWDDVK RYNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDPVDATYYCARTVSSGYIYAMDYWGQGT LVTVSS y una región variable de cadena ligera de DIQMTPSPSSLSASVGDVRTISCRASQDIRNLYLNWYQQKPGKAPKLLIFYTSKLSHSGVPSR FSGSGSGTDYTLTISLQPEDIATYYCQQGNLPLTFGGGTKEIK.

La presente invención y realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones anexas.

En ciertos casos, la presente divulgación se refiere a anticuerpos y fragmentos de anticuerpo purificados, aislados que se unen a IL-13 así como a composiciones farmacéuticas que comprenden tales anticuerpos y fragmentos. En ciertos casos, la divulgación está relacionada con anticuerpos aislados, o partes de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-13 humana. Los anticuerpos anti-IL-13 aislados de la presente divulgación se pueden usar en ámbito clínico así como en investigación y desarrollo. En ciertos casos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-IL-13 que comprende las secuencias de cadena pesada y ligera identificadas en la Figura 1.

Ciertos casos de la divulgación se refieren a métodos de purificación de anticuerpos anti-IL-13, o partes de unión a antígeno de los mismos, a partir de una matriz de muestra para volver los anticuerpos sustancialmente libres de proteínas de célula hospedadora ("HCP") y Proteína A lixiviada. En ciertos casos, la matriz de muestra (o simplemente "muestra") comprende una línea celular empleada para producir anticuerpos anti-IL-13 de la presente divulgación. En casos particulares, la muestra comprende una línea celular usada para producir anticuerpos anti-IL-13 humanos.

En ciertos casos, la presente divulgación proporciona un método de purificación de anticuerpos frente a IL-13 que comprende una etapa de recuperación primaria para, entre otras cosas, retirar células y residuos celulares. En ciertos casos del método, la etapa de recuperación primaria incluye una o más etapas de centrifugación o filtración de lecho profundo. Por ejemplo, y no a modo de limitación, tales etapas de centrifugación se pueden llevar a cabo de aproximadamente 7000 x g a aproximadamente 11.000 x g. Además, ciertos casos del método descrito anteriormente incluirán una etapa de filtración en lecho profundo, tal como una etapa de filtración en lecho profundo

Delipid.

En ciertos casos, la muestra de recuperación primaria se somete a una etapa de cromatografía de afinidad. La etapa de cromatografía de afinidad comprende someter la muestra de recuperación primaria a una columna que comprende un soporte cromatográfico de afinidad adecuado. Algunos ejemplos no limitantes de tales soportes cromatográficos incluyen, pero no se limitan a, resina de Proteína A, resina de Proteína G, soportes de afinidad que comprenden el antígeno contra el que se dirige el anticuerpo de interés, y soportes de afinidad que comprenden una proteína de unión a Fc. La resina de Proteína A es útil para purificación por afinidad y aislamiento de anticuerpos (IgG). En un aspecto, una columna de Proteína A se equilibra con un tampón adecuado antes de cargar la muestra. Un ejemplo de un tampón adecuado es un tampón de Tris/NaCl, a pH de aproximadamente 7,2. Después de este equilibrado, la muestra se puede cargar en la columna. Después de la carga de la columna, la columna se puede lavar una o múltiples veces usando, por ejemplo, el tampón de equilibrado. Se pueden usar otros lavados, incluyendo lavados que empleen diferentes tampones, antes de eluir la columna. La columna de Proteína A se puede eluir a continuación usando el tampón de elución apropiado. Un ejemplo de un tampón de elución adecuado es un tampón de ácido acético/NaCl, a pH de aproximadamente 3,5. El eluato se puede monitorizar usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede seguir la absorbancia a DO₂₈₀. A continuación, se pueden preparar la fracción o fracciones eluidas de interés para procesamiento adicional.

Una etapa de ajuste de pH bajo sigue a la cromatografía de afinidad a Proteína A. En tales casos, el eluato de Proteína A que comprende el anticuerpo anti-IL-13 supuesto, o la parte de unión a antígeno del mismo, se somete a un ajuste de pH a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 4. En ciertos aspectos, el pH se ajusta a aproximadamente 3,5. El pH bajo, entre otras cosas, promueve la reducción y/o inactivación de virus sensibles al pH que puedan estar contaminando la muestra. Después de un período de tiempo adecuado, el pH se ajusta entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,0, incluyendo, pero sin limitarse a, aproximadamente 5,0, y la muestra se somete a etapas de purificación adicionales.

En ciertos casos, una etapa de intercambio iónico sigue a la cromatografía de afinidad a Proteína A o la etapa de ajuste de pH bajo. Esta etapa de intercambio iónico puede ser intercambio catiónico o aniónico o una combinación secuencial de ambos. Esta etapa puede ser un procedimiento de intercambio iónico individual o puede incluir múltiples etapas de intercambio iónico tales como una etapa de intercambio catiónico seguida de una etapa de intercambio aniónico o viceversa. En un aspecto, la etapa de intercambio iónico es un procedimiento en una etapa. En otro aspecto, la etapa de intercambio iónico implica un proceso de intercambio iónico en dos etapas. Una columna de intercambio catiónico adecuada es una columna cuya fase estacionaria comprende grupos aniónicos. Un ejemplo de tal columna es Fractogel™ SO₃⁻. Esta etapa de cromatografía de captura por intercambio iónico facilita el aislamiento de los anticuerpos de una muestra. Una columna de intercambio aniónico adecuada es una columna cuya fase estacionaria comprende grupos catiónicos. Un ejemplo de tal columna es una columna Q Sepharose™. Una alternativa es un cartucho de membrana Mustang Q de Pall. Las una o más etapas de intercambio iónico aíslan adicionalmente los anticuerpos mediante la reducción de impurezas tales como proteínas de célula hospedadora y ADN y, cuando sea aplicable, proteína de matriz de afinidad. Este procedimiento de intercambio aniónico es una modalidad de cromatografía de flujo a través en la que los anticuerpos de interés no interactúan ni se unen a la resina de intercambio aniónico (o fase sólida). Sin embargo, numerosas impurezas interactúan con y se unen a la resina de intercambio iónico. En un aspecto particular, la etapa de intercambio iónico es cromatografía de intercambio aniónico.

El eluato de cromatografía de afinidad se prepara para cromatografía de intercambio iónico mediante el ajuste del pH y la fuerza iónica del tampón de muestra. Por ejemplo, el eluato de afinidad se puede ajustar a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8,5 en un tampón Tris 1 M. Antes de cargar la muestra (eluato de afinidad) en la columna de intercambio iónico, la columna se puede equilibrar usando un tampón adecuado. Un ejemplo de un tampón adecuado es un tampón Tris/NaCl con un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8. Después del equilibrado, la columna se puede cargar con el eluato de afinidad. Después de la carga, la columna se puede lavar una o múltiples veces con un tampón adecuado. Un ejemplo de un tampón adecuado es el propio tampón de equilibrado. La recogida de flujo a través puede comenzar, por ejemplo, cuando la absorbancia (DO₂₈₀) aumenta más de aproximadamente 0,2 UA.

En ciertos casos, se llevan a cabo una primera y una segunda etapas de intercambio iónico después de la recuperación primaria o de otro modo en ausencia de una etapa de cromatografía de afinidad. En algunos de tales casos, la muestra de intercambio iónico se somete a una etapa de filtración intermedia, ya sea antes de la primera etapa de intercambio iónico, entre las dos etapas de intercambio iónico, o ambas. En ciertos aspectos, la etapa de filtración comprende ultrafiltración/diafiltración ("UF/DF") de captura. Entre otras cosas, tal filtración facilita la concentración y el intercambio de tampón de los anticuerpos anti-IL-13 y las partes de unión a antígeno de los mismos.

El método comprende una o más etapas de cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC"). Una columna de HIC adecuada es aquella cuya fase estacionaria comprende grupos hidrófobos. Un ejemplo no limitante de tal columna es una columna Fenil HP Sepharose™. En ciertas circunstancias los anticuerpos anti-IL-13 formarán agregados durante el proceso de aislamiento/purificación. La inclusión de una o más etapas de HIC facilita la reducción o

eliminación de tales agregados. HIC también ayuda en la retirada de impurezas. En ciertas realizaciones, la etapa de HIC emplea un tampón de alta concentración salina para promover la interacción de los anticuerpos anti-IL-13 (o los agregados de los mismos) con la columna hidrófoba. Los anticuerpos anti-IL-13 se pueden eluir a continuación usando concentraciones inferiores de sal.

En ciertas realizaciones, el eluato de HIC se filtra usando un filtro de retirada viral tal como, pero no limitado a, un filtro Ultipor DV50™ (Pall Corporation, East Hills, N.Y.). En tales realizaciones también se pueden usar filtros alternativos, tales como filtros Viresolve™ (Millipore, Billerica, Mass.); filtros Zeta Plus VR™ (CUNO; Meriden, Conn.); y filtros Planova™ (Asahi Kasei Pharma, Planova Division, Buffalo Grove, Ill.).

En ciertos casos, la divulgación se refiere a una o más composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-IL-13 aislado o una parte de unión a antígeno del mismo y un vehículo aceptable. En un aspecto, la composición comprende además uno o más anticuerpos o una parte de unión a antígeno de los mismos además del anticuerpo anti-IL-13. En otro aspecto, las composiciones comprenden además uno o más agentes farmacéuticos.

La pureza de los anticuerpos de interés en el producto de muestra resultante se puede analizar usando métodos bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, ensayo de HPLC Poros™ A, ELISA de HCP, ELISA de Proteína A, y análisis de transferencia de Western.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 desvela las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de un ejemplo no limitante de anticuerpo anti-IL-13.

La Figura 2 desvela un diagrama de flujo de un proceso de cultivo celular a modo de ejemplo, incluyendo puntos de ajuste, en ensayos de control de procesos, y límites de acción.

La Figura 3 desvela una comparación de estrategias alternativas de flujo de procesos de cultivo celular.

La Figura 4 desvela un diagrama de flujo de un proceso de cromatografía de captura de recuperación primaria, incluyendo puntos de ajuste, en ensayos de control de procesos, y límites de acción.

La Figura 5 desvela una comparación de estrategias alternativas de recuperación primaria y flujo de captura.

La Figura 6 desvela un diagrama de flujo de proceso de purificación fina, incluyendo puntos de ajuste, en ensayos de control de procesos, y límites de acción.

La Figura 7 desvela una comparación de estrategias alternativas de flujo de purificación fina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente divulgación se refiere a anticuerpos que se unen a IL-13. En un aspecto, la divulgación está relacionada con anticuerpos aislados, o partes de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-13 humana. El anticuerpo anti-IL-13 aislado de la presente divulgación se puede usar en ámbito clínico así como en investigación y desarrollo. La presente divulgación también está relacionada con métodos para purificar anticuerpos anti-IL-13, o partes de unión a antígeno de los mismos. Algunos anticuerpos anti-IL-13 adecuados que se pueden purificar en el contexto de la presente divulgación se desvelan en el documento de Solicitud PCT n.º PCT/US2007/019660, incluyendo el anticuerpo que se ha identificado posteriormente como ABT-308. Se exponen secuencias de cadena pesada y ligera de anticuerpo anti-IL-13 a modo de ejemplo en la Figura 1. La presente divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-IL-13 o partes de unión a antígeno de los mismos que se describen en el presente documento.

En aras de la claridad y no a modo de limitación, la presente descripción detallada se divide en las siguientes subsecciones:

1. Definiciones;
2. Generación de anticuerpos;
3. Producción de anticuerpos;
4. Purificación de anticuerpos;
5. Métodos para someter a ensayo la pureza de la muestra;
6. Modificaciones adicionales;
7. Composiciones farmacéuticas; y
8. Usos de anticuerpos.

1. Definiciones

Para que la presente invención se pueda comprender con mayor facilidad, en primer lugar se definen ciertos términos.

El término "anticuerpo" incluye una molécula de inmunoglobulina comprendida por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (HA) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento HCVR o VH) y

una región constante de cadena pesada (CH). La región constante de cadena pesada está comprendida por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal al extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o "parte de anticuerpo") incluye fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hIL-13). Se ha mostrado que se puede llevar a cabo la función de unión a antígeno de un anticuerpo mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Algunos ejemplos de fragmentos de unión incluidos en la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que comprende los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento divalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que comprende los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que comprende los dominios VL y VH de un brazo individual de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que comprende un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican mediante genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permita prepararse como una cadena proteica individual en la que se emparejen las regiones VL y VH para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos monocatenarios estén incluidos en la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. También están incluidas otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como dianticuerpos. Los dianticuerpos son anticuerpos disespecíficos divalentes en los que los dominios VH y VL se expresan en una cadena polipeptídica individual, pero usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, forzando de ese modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Además, un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión mayor, formada mediante asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la parte de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Algunos ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de estreptoavidina para preparar una molécula de scFv tetrámera (Kipriyanov, S. M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101), y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para preparar moléculas de scfv divalentes y biotinadas (Kipriyanov, S. M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Las partes de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de los anticuerpos completos. Además, se pueden obtener anticuerpos, partes de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión usando técnicas de ADN recombinante convencionales, como se describe en el presente documento. En un aspecto, las partes de unión a antígeno son dominios completos o pares de dominios completos.

La expresión "interleuquina 13 humana" (abreviada en el presente documento hIL-13, o IL-13), como se usa en el presente documento, se refiere a una glicoproteína de 17 kDa clonada a partir de linfocitos T activados (Zurawski y de Vries, 1994 *Immunol Today* 15 19-26) y que se produce por linfocitos T activados del linaje Th2. Los linfocitos T CD4+ Th0 y Th1, los linfocitos T CD8+, y varias poblaciones que no son linfocitos T tales como mastocitos también producen IL-13 (Zurawski y de Vries, 1994 *Immunol Today* 15 19-26). La función de IL-13 incluye la promoción del intercambio de isotipo de inmunoglobulina a IgE en linfocitos B humanos (Punnonen, Aversa *et al.* 1993 *Proc Natl Acad Sci USA* 90 3730-4) y la supresión de producción de citoquinas inflamatorias tanto en seres humanos como en ratones (de Waal *et al.*, 1993 *J Immunol* 151 6370-81; Doherty *et al.*, 1993 *J Immunol* 151 7151-60). IL-13 se une a receptores de la superficie celular identificados como IL-13R α 1 y IL-13R α 2. El receptor IL-13R α 1 interactúa con IL-13 con baja afinidad (KD ~ 10 nM), seguido del reclutamiento de IL-4R para formar el complejo receptor heterodímero de señalización de alta afinidad (KD ~ 0.4 nM) (Aman *et al.*, 1996 *J Biol Chem* 271 29265-70; Hilton *et al.*, 1996 *Proc Natl Acad Sci USA* 93497-501). El complejo IL-4R/IL-13R α 1 se expresa en numerosos tipos de células tales como linfocitos B, monocitos/macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales de las vías respiratorias, y células de músculo liso de las vías respiratorias (Graber *et al.*, 1998 *Eur J Immunol* 28 4286-98; Murata *et al.*, 1998 *Int Immunol* 101103-10; Akaiwa *et al.*, 2001 *Cytokine* 13 75-84). El ligamiento del complejo receptor IL-13R α 1/IL-4R da como resultado la activación de una diversidad de rutas de transducción de señales incluyendo las rutas del transductor y activador de la señal de transcripción (STAT6) y del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2) (Wang *et al.*, 1995 *Blood* 864218-27; Takeda *et al.*, 1996 *J Immunol* 157 3220-2). La cadena de IL-13R α 2 por sí sola tiene alta afinidad (KD ~ 0,25-0,4 nM) por IL-13, y funciona tanto como receptor señuelo que regula negativamente la unión de IL-13 (Donaldson, Whitters *et al.* 1998 *J Immunol* 161 2317-24), como receptor de señalización que induce síntesis de TGF- β y fibrosis a través de la ruta de AP-1 en macrófagos y posiblemente otros tipos de células (Fichtner-Feigl *et al.*, 2006 *Nat Med* 12 99-106). El ácido nucleico que codifica IL-13 esta disponible con el n.º de acceso de GenBank NM_002188 y la secuencia polipeptídica está

disponible con el n.º de acceso de GenBank NP_002179. Se pretende que la expresión IL-13 humana incluya IL-13 humana recombinante (rh IL-13), que se puede preparar mediante métodos convencionales de expresión recombinante.

5 Las expresiones "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "etiquetado de Kabat" se usan de forma intercambiable en el presente documento. Estas expresiones, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de restos de aminoácido que son más variables (es decir, hipervariables) que otros restos de aminoácido en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo (Kabat *et al.* (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 y, Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos de América, Publicación NIH n.º 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable varía de las posiciones de aminoácido 31 a 35 para CDR1, las posiciones de aminoácido 50 a 65 para CDR2, y las posiciones de aminoácido 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable varía de las posiciones de aminoácido 24 a 34 para CDR1, las posiciones de aminoácido 50 a 56 para CDR2, y las posiciones de aminoácido 89 a 97 para CDR3.

La expresión "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen las regiones variable y constante correspondientes a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humanas como describen Kabat *et al.* (véase Kabat, *et al.* (1991) Sequences of proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos de América, Publicación NIH n.º 91-3242). Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir restos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatorias o específicas de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, CDR3. Las mutaciones se pueden introducir usando el "enfoque de mutagénesis selectiva". El anticuerpo humano puede tener al menos una posición reemplazada con un resto de aminoácido, por ejemplo, un resto de aminoácido potenciador de la actividad que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana. El anticuerpo humano puede tener hasta veinte posiciones reemplazadas con restos de aminoácido que no son parte de la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana. En otros casos, están reemplazadas hasta diez, hasta cinco, hasta tres o hasta dos posiciones. En un caso, estos reemplazos son dentro de las regiones CDR. Sin embargo, no se pretende que la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR procedentes de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como un ratón, en las secuencias marco humanas.

La expresión "enfoque de mutagénesis selectiva" incluye un método para mejorar la actividad de un anticuerpo mediante selección y mutación individual de aminoácidos de CDR en al menos una posición de mutagénesis selectiva adecuada, hipermutación, y/o posición de contacto. Un anticuerpo humano "mutado selectivamente" es un anticuerpo que comprende una mutación en una posición seleccionada usando un enfoque de mutagénesis selectiva. En otro aspecto, se pretende que el enfoque de mutagénesis selectiva proporcione un método para mutar preferentemente restos de aminoácido individuales seleccionados en CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena pesada (en lo sucesivo en el presente documento H1, H2, y H3, respectivamente), o CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena ligera (denominado en lo sucesivo en el presente documento L1, L2, y L3, respectivamente) de un anticuerpo. Los restos de aminoácido se pueden seleccionar entre posiciones de mutagénesis selectiva, posiciones de contacto, o posiciones de hipermutación. Los aminoácidos individuales se seleccionan basándose en su posición en la región variable de cadena ligera o pesada. Se ha de entender que una posición de hipermutación también puede ser una posición de contacto. En un aspecto, el enfoque de mutagénesis selectiva es un "enfoque dirigido". Se pretende que la expresión "enfoque dirigido" incluya un método de mutación de restos de aminoácido individuales seleccionados en CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena pesada o CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena ligera de un anticuerpo de forma dirigida, por ejemplo, un "enfoque dirigido por grupo" o "enfoque dirigido por CDR". En el "enfoque dirigido por grupo", restos de aminoácido individuales en grupos particulares se dirigen para mutaciones selectivas incluyendo los grupos I (que incluye L3 y H3), II (que incluye H2 y L1) y III (que incluye L2 y H1), enumerándose los grupos en orden de preferencia para la dirección. En el "enfoque dirigido por CDR", restos de aminoácido individuales en CDR particulares se dirigen para mutaciones selectivas con el orden de preferencia para la dirección que sigue a continuación: H3, L3, H2, L1, H1 y L2. El resto de aminoácido seleccionado se muta, por ejemplo, en al menos dos restos de aminoácido distintos, y se determina el efecto de la mutación en la actividad del anticuerpo. La actividad se mide como un cambio en la especificidad de unión/afinidad del anticuerpo, y/o neutralización de la potencia del anticuerpo. Se ha de entender que el enfoque de mutagénesis selectiva se puede usar para la optimización de cualquier anticuerpo procedente de cualquier fuente incluyendo presentación en fagos, animales transgénicos con genes de línea germinal de IgG humanos, anticuerpos humanos aislados de linfocitos B humanos. El enfoque de mutagénesis selectiva se puede usar en anticuerpos que no se pueden optimizar más usando tecnología de presentación en fagos. Se ha de entender que los anticuerpos de cualquier fuente incluyendo presentación en fagos, animales transgénicos con genes de línea germinal de IgG humanos, anticuerpos humanos aislados de linfocitos B humanos, se pueden someter a mutación inversa antes o después del enfoque de mutagénesis selectiva.

La expresión "anticuerpo humano recombinante" incluye anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante

transfectado en una célula hospedadora, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria recombinante, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humanos (véase, por ejemplo, Taylor, L. D., *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humanas a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humanas (véase Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos de América, Publicación NIH n.º 91-3242). Sin embargo, en ciertos casos, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y de ese modo las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, cuando proceden de o están relacionadas con secuencias de VH y VL de línea germinal humanas, pueden no existir de forma natural en el repertorio *in vivo* de línea germinal de anticuerpos humano. Sin embargo, en ciertos casos, tales anticuerpos recombinantes son el resultado de enfoque de mutagénesis selectiva o mutación inversa o ambos.

Un "anticuerpo aislado" incluye un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-13 está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de hIL-13). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-13 puede unirse a moléculas de IL-13 de otras especies. Sin embargo, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de cualquier otro material celular y/o compuesto químico.

Un "anticuerpo neutralizante" (o un "anticuerpo que neutraliza la actividad de hIL-13") incluye un anticuerpo cuya unión a hIL-13 da como resultado la inhibición de la actividad biológica de hIL-13. Esta inhibición de la actividad biológica de hIL-13 se puede evaluar por medición de uno o más indicadores de la actividad biológica de hIL-13. Estos indicadores de la actividad biológica de hIL-13 se pueden evaluar mediante uno o más de varios ensayos convencionales *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica.

El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad de unión/afinidad de un anticuerpo por un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-13 que se une a un antígeno IL-13 y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-13 cuya unión a hIL-13 inhibe la actividad biológica de hIL-13.

La expresión "resonancia plasmónica superficial" incluye un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas en una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, véanse Jonsson, U., *et al.* (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U., *et al.* (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., *et al.* (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; y Johnsson, B., *et al.* (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

El término "Koff", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad *off* para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

El término "Kd", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

La expresión "molécula de ácido nucleico" incluye moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero en un aspecto es ADN bicatenario.

La expresión "molécula de ácido nucleico aislada", como se usa en el presente documento por referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o partes de anticuerpo (por ejemplo, VH, VL, CDR3), por ejemplo los que se unen a hIL-13, incluye una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo o la parte de anticuerpo están exentas de otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o partes de anticuerpo que se unen a antígenos distintos de hIL-13, secuencias distintas que pueden flanquear de forma natural el ácido nucleico en el ADN genómico humano. De ese modo, por ejemplo, un ácido nucleico aislado de la divulgación que codifica una región VH de un anticuerpo anti-hIL-13 no contiene ninguna otra secuencia que codifique otras regiones VH que se unan a antígenos distintos de, por ejemplo, hIL-13. La expresión "molécula de ácido nucleico aislada" también pretende incluir secuencias que codifican anticuerpos diespecíficos divalentes, tales como dianticuerpos en los que las regiones VH y VL no contienen ninguna otra secuencia distinta de las secuencias del dianticuerpo.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora") incluye una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se ha de entender que tales expresiones pretenden referirse no solo a la célula objeto particular, sino también a la progenie de tal célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones posteriores debido a mutaciones o influencias ambientales, de hecho tal progenie puede no ser idéntica a la célula precursora, pero aún está incluida dentro del ámbito de la expresión "célula hospedadora" como se usa en el presente documento.

El término "modificar", como se usa en el presente documento, pretende referirse a cambiar uno o más aminoácidos en los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos. El cambio se puede producir por adición, sustitución o delección de un aminoácido en una o más posiciones. El cambio se puede producir usando técnicas conocidas, tales como mutagénesis por PCR.

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, pretende referirse a intervalos de aproximadamente un 10-20 % más o menos el valor referenciado. En ciertas circunstancias, el experto en la materia reconocerá que, debido a la naturaleza del valor referenciado, el término "aproximadamente" puede significar más o menos de una desviación de un 10-20 % de ese valor.

La expresión "reducción/inactivación viral", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una disminución en el número de partículas virales en una muestra particular ("reducción"), así como a una disminución en la actividad, por ejemplo, pero no limitado a, la infectividad o capacidad de replicación, de las partículas virales en una muestra particular ("inactivación"). Tales disminuciones en el número y/o actividad de partículas virales pueden ser del orden de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 99 %, incluyendo de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 99 %, incluyendo de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 99 %, incluyendo de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 99 %, incluyendo de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 99 %, incluyendo de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 99 %, incluyendo de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 99 %, incluyendo de aproximadamente un 80 % a un 99 %, e incluyendo de aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 99 %. En ciertas realizaciones no limitantes, la cantidad de virus, si hubiera, en el producto de anticuerpo purificado es menos que DI50 (la cantidad de virus que infectará un 50 por ciento de una población diana) para ese virus, es al menos 10 veces menos que DI50 para ese virus, o al menos 100 veces menos que DI50 para ese virus, o al menos 1000 veces menos que DI50 para ese virus.

La expresión "posición de contacto" incluye una posición de aminoácido en CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera de un anticuerpo que esta ocupada por un aminoácido que está en contacto con antígeno en una de las veintiséis estructuras anticuerpo-antígeno conocidas. Si un aminoácido de CDR en cualquiera de las veintiséis estructuras resueltas conocidas de complejos anticuerpo-antígeno está en contacto con el antígeno, entonces se puede considerar que ese aminoácido ocupa una posición de contacto. Las posiciones de contacto tienen una mayor probabilidad de estar ocupadas con un aminoácido que está en contacto con antígenos que una posición de no contacto. En un aspecto, una posición de contacto es una posición de CDR que contiene un aminoácido que está en contacto con antígeno en más de 3 de las 26 estructuras (> 1,5 %). En otro aspecto, una posición de contacto es una posición de CDR que contiene un aminoácido que está en contacto con antígeno en más de 8 de las 25 estructuras (> 32 %).

2. Generación de anticuerpos

El término "anticuerpo", como se usa en la presente sección, se refiere a un anticuerpo intacto o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden generar mediante una diversidad de técnicas, incluyendo inmunización de un animal con el antígeno de interés seguido de metodologías convencionales de anticuerpos monoclonales, por ejemplo la técnica convencional de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495. Aunque son preferentes procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas es un procedimiento muy bien establecido. Se conocen en la técnica protocolos de inmunización y técnicas para aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión. También se conocen compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murinas) y procedimientos de fusión.

Un anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, quimérico, o humanizado. Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente divulgación se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se ha descrito anteriormente. Se puede obtener ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera del hibridoma no humano de interés y someterlo a ingeniería para que contenga secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, se pueden unir regiones variables murinas a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567 de Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, se pueden insertar regiones CDR murinas en un marco humano usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.225.539 de Winter, y los documentos de patente de Estados Unidos con números 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*).

En un caso no limitante, los anticuerpos de la presente divulgación son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos frente a IL-13 se pueden generar usando ratones transgénicos o

transcromosómicos que portan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen los ratones denominados en el presente documento HuMAb Mouse® (Medarex, Inc.), KM Mouse® (Medarex, Inc.), y XenoMouse® (Amgen).

5 Además, están disponibles en la técnica sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y se pueden usar para cultivar los anticuerpos de la divulgación, tales como anticuerpos anti-IL-13. Por ejemplo, se pueden usar ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka *et al.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que portan transcromosomas de cadena pesada y ligera humanos (por ejemplo, Kuroiwa *et al.* (2002) Nature Biotechnology 20:889-894 y documento de solicitud PCT n.º WO 2002/092812) y se pueden usar para cultivar los anticuerpos anti-IL-13 de la presente divulgación.

15 Los anticuerpos humanos recombinantes de la divulgación incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos anti-IL-13, una parte de unión a antígeno de los mismos, o anticuerpos anti-IL-13 relacionado, que se desvelan en el presente documento se pueden aislar mediante análisis sistemático de una biblioteca combinatoria de anticuerpos recombinantes, por ejemplo, una biblioteca de presentación en fagos de scFv, preparada usando ADNc de VL y VH humano preparado a partir de ARNm procedente de linfocitos humanos. Se conocen en la técnica metodologías para preparar y analizar sistemáticamente tales bibliotecas. Además de los kits disponibles en el mercado para generar bibliotecas de presentación en fagos (por ejemplo, el sistema Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, n.º de catálogo 27-9400-01; y el kit de presentación en fagos SurfZAP™ de Stratagene, n.º de catálogo 240612), se pueden encontrar ejemplos de métodos y reactivos particularmente adecuados para su uso en la generación y análisis sistemático de bibliotecas de presentación de anticuerpos en, por ejemplo, Ladner *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.223.409; Kang *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 92/18619; Dower *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 91/17271; Winter *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 92/20791; Markland *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 92/15679; Breitling *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 93/01288; McCafferty *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 92/01047; Garrard *et al.*, documento de Publicación PCT n.º WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse *et al.* (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, Nature (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) Nature 352:624-628; Gram *et al.* (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; y Barbas *et al.* (1991) PNAS 88:7978-7982.

35 Los anticuerpos monoclonales humanos de la presente divulgación también se pueden preparar usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de un modo tal que se pueda generar una respuesta de anticuerpos humanos después de inmunización. Tales ratones se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson *et al.*

40 En ciertos casos, los métodos de la divulgación incluyen anticuerpos anti-IL-13 y partes de anticuerpo, anticuerpos anti-IL-13 relacionado y partes de anticuerpo, y anticuerpos humanos y partes de anticuerpo con propiedades equivalentes a anticuerpos anti-IL-13, tales como alta afinidad de unión a hIL-13 con baja cinética de disociación y alta capacidad neutralizante. En un aspecto, la divulgación proporciona el tratamiento con un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se disocia de hIL-13 con una Kd de aproximadamente 1×10^{-8} M o menos y una constante de velocidad Koff de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, determinadas ambas mediante resonancia plasmónica superficial. En casos no limitantes específicos, un anticuerpo anti-IL-13 purificado de acuerdo con la divulgación inhibe competitivamente la unión de ABT-308 a IL-13 en condiciones fisiológicas.

50 En otro caso más de la divulgación, se pueden alterar anticuerpos o fragmentos de los mismos tales como, pero no limitados a, anticuerpos anti-IL-13 o fragmentos de los mismos, en los que la región constante del anticuerpo se modifica para reducir al menos una función efectora biológica mediada por la región constante con respecto a un anticuerpo sin modificar. Para modificar un anticuerpo de la divulgación de un modo tal que exhiba una reducción de unión al receptor de Fc, el segmento de la región constante de inmunoglobulina del anticuerpo se puede mutar en regiones particulares necesarias para las interacciones con el receptor de Fc (FcR) (véanse, por ejemplo, Canfield y Morrison (1991) J. Exp. Med. 173:1483-1491; y Lund *et al.* (1991) J. of Immunol. 147:2657-2662). La reducción en la capacidad de unión a FcR del anticuerpo también puede reducir otros efectos o funciones que dependen de las interacciones de FcR, tales como opsonización y fagocitosis y citotoxicidad celular dependiente de antígeno.

3. Producción de anticuerpos

60 **3.1 Estrategias generales de producción**

65 Para expresar un anticuerpo de la divulgación, se insertan los ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de longitud parcial o total en uno o más vectores de expresión de un modo tal que los genes se unan operativamente a secuencias de control transcripcional y traduccional (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.914.128). En este contexto, se pretende que la expresión "unido operativamente" indique que el gen del

anticuerpo está ligado a un vector de un modo tal que las secuencias de control transcripcional y traduccional en el vector sirven para su función pretendida de regulación de la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo se pueden insertar en un vector separado o, más habitualmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en un vector de expresión mediante métodos convencionales (por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen de anticuerpo y el vector, o ligamiento de extremos abiertos si no hay sitios de restricción presentes). Antes de la inserción del anticuerpo o las secuencias de cadena ligera o pesada relacionadas con el anticuerpo, el vector de expresión puede portar ya las secuencias de región constante del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque para convertir el anticuerpo anti-IL-13 o secuencias de VH y VL relacionadas con el anticuerpo anti-IL-13 en genes de anticuerpo de longitud completa es insertarlas en vectores de expresión que ya codifiquen las regiones constante de cadena pesada y constante de cadena ligera, respectivamente, de un modo tal que el segmento de VH esté unido operativamente al segmento de segmentos de CH en el vector y el segmento de VL esté unido operativamente al segmento de CL en el vector. Además, o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilite la secreción de una cadena de anticuerpo de una célula hospedadora. El gen de cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector de un modo tal que el péptido de señal esté unido en el marco al extremo amino terminal del gen de cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína que no es inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, un vector de expresión recombinante de la divulgación puede portar una o más secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliladenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). El experto en la materia entenderá que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la selección de la célula hospedadora que se transforma, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras adecuadas para la expresión en células hospedadoras de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores procedentes de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), Virus simio 40 (SV40) (tales como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para una descripción adicional de elementos reguladores virales, y secuencias de los mismos, véanse, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.168.062 de Stinski, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.510.245 de Bell *et al.* y el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.968.615 de Schaffner *et al.*

Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, un vector de expresión recombinante de la divulgación puede portar una o más secuencias adicionales, tales como una secuencia que regule la replicación del vector en las células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y/o un gen marcador seleccionable. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos con números 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todos ellos de Axel *et al.*). Por ejemplo, habitualmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación mediante metotrexato) y el gen neo (para selección mediante G418).

Un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la divulgación se puede preparar mediante expresión recombinante de genes de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula hospedadora. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, se transfecta una célula hospedadora con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de un modo tal que las cadenas ligera y pesada se expresen en la célula hospedadora y se secreten en el medio en el que se cultivan las células hospedadoras, medio del que se pueden recuperar los anticuerpos. Se usan metodologías convencionales de ADN recombinante para obtener genes de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo, incorporar estos genes a vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células hospedadoras, tales como las descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel *et al.* (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) y en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 4.816.397 y 6.914.128.

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" pretenden incluir una amplia diversidad de técnicas usadas habitualmente para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similar. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la divulgación en células hospedadoras procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, tales como células hospedadoras de mamífero, es adecuada debido a que es más probable que

tales células eucariotas, y en particular las células de mamífero, ensamblen y secreten un anticuerpo plegado de forma apropiada e inmunológicamente activo, que las células procariotas. Se ha informado que la expresión procariota de genes de anticuerpo es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss y Wood (1985) Immunology Today 6:12-13).

5 Algunas células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento son las células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores descritas anteriormente. Algunos procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación *E. coli* adecuado es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos y levaduras son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el utilizado con la mayor frecuencia entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, una diversidad de otros géneros, especies y cepas está disponible habitualmente en el mercado y es útil en el presente documento, tal como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolytocladium*, y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Algunas células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpos glicosilados proceden de organismos multicelulares. Algunos ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y las correspondientes células hospedadoras permisivas de insecto entre hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una diversidad de cepas virales para transfección está disponible de forma pública, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y tales virus se pueden usar como el virus en el presente documento de acuerdo con la presente divulgación, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden utilizar como hospedadores cultivos de células de plantas de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

Algunas células hospedadoras de mamífero adecuadas para expresar los anticuerpos recombinantes de la divulgación incluyen células de Ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) PNAS USA 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen por cultivo de las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que crecen las células hospedadoras. Otros ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 renal de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea renal embrionaria humana (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células renal de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de Mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata de Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para producción de anticuerpos y se cultivan en medios de nutrientes convencionales según sea adecuado para introducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células hospedadoras usadas para producir un anticuerpo se pueden cultivar en una diversidad de medios. Algunos medios disponibles en el mercado tales como Ham's F10™ (Sigma), Minimal Essential Medium™ ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Dulbecco's Modified Eagle's Medium™ ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58:44

(1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102:255(1980), los documentos de Patente de Estados Unidos con números 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; el documento de Patente WO 90/03430; el documento de Patente WO 87/00195; o el documento de Patente de Estados Unidos n.º re. 30.985 se puede usar como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco gentamicina), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que conocerían los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las usadas anteriormente con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto habitual en la materia.

También se pueden usar células hospedadoras para producir partes de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entiende que las variaciones en el procedimiento anterior están dentro del ámbito de la presente divulgación. Por ejemplo, en ciertos casos, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con ADN que codifica bien la cadena ligera o bien la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de la presente divulgación. También se puede usar tecnología de ADN recombinante para retirar cierta cantidad o la totalidad del ADN que codifica cualquiera de las dos o ambas de las cadenas ligera y pesada que no sean necesarias para unirse a IL-13, específicamente hIL-13. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también están incluidas en los anticuerpos de la divulgación. Además, se pueden producir anticuerpos difuncionales en los que una cadena pesada y una cadena ligera son un anticuerpo de la divulgación y las otras cadenas pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de IL-13 por reticulación de un anticuerpo de la divulgación con un segundo anticuerpo mediante métodos de reticulación química convencionales.

En un sistema adecuado para expresión recombinante de un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, de la divulgación, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada de anticuerpo como la cadena ligera de anticuerpo en células CHO dhfr- mediante transfección mediada con fosfato de calcio. En el vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo están unidos cada uno operativamente a los elementos reguladores potenciador de CMV/promotor de AdMLP para conseguir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo y se recupera anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se usan técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar las transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir de forma intracelular, en el espacio periplasmático, o secretarse directamente al medio. En un aspecto, si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como primera etapa, se pueden retirar los residuos formados por partículas, ya sean células hospedadoras o células lisadas (por ejemplo, resultantes de homogeneización), por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se pueden concentrar en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon™ o Millipore Pellicon™.

Antes del proceso de la invención, los procesos para la purificación de anticuerpos a partir de residuos celulares dependían inicialmente del sitio de expresión de anticuerpo. Algunos anticuerpos se pueden secretar directamente desde la célula al medio de cultivo circundante; otros se secretan de forma intracelular. Para los últimos anticuerpos, la primera etapa de un proceso de purificación implica por lo general: lisis de la célula, que se puede realizar mediante una diversidad de métodos, incluyendo cizalladura mecánica, choque osmótico, o tratamientos enzimáticos. Tal alteración libera los contenidos completos de la célula al homogenato, y además produce fragmentos subcelulares que son difíciles de retirar debido a su pequeño tamaño. Estos se retiran generalmente por centrifugación diferencial o por filtración. Cuando se secreta el anticuerpo, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon™ o Millipore Pellicon™. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, las células hospedadoras recombinantes también se pueden separar del medio de cultivo celular, por ejemplo, mediante filtración de flujo tangencial. Además, se pueden recuperar anticuerpos del medio de cultivo usando los métodos de purificación de anticuerpos de la invención.

3.2. Estrategia de producción a modo de ejemplo

En ciertas realizaciones, la etapa inicial de producción de anticuerpo anti-IL-13 implica el uso de operaciones con matraz para rotor y bolsas Biowave para expandir las células CHO que expresan anticuerpo anti-IL-13 a partir de un vial congelado individual hasta la biomasa deseada para la inoculación de un reactor de semilla de 110 l. Se descongela un vial congelado de células CHO de banco celular maestro y se coloca en medio de cultivo (SR-512) y

se centrifuga. Las células se resuspenden en medio de cultivo y se expanden a 37 °C y CO₂ al 5 % en matraces para rotor desechables, frascos de agitación, y/o bolsas Biowave de volumen creciente. Se usan bolsas onduladas de 20 l por duplicado para maximizar la expansión de masa celular final antes de la inoculación en el biorreactor de semilla. Cuando la densidad celular alcanza $\geq 2,0 \times 10^6$ células viables/ml a partir de ambas bolsas onduladas de 20 l en aproximadamente 15-17 días, el cultivo se transfiere a un biorreactor de semilla de 110 l cargado con medio de crecimiento SR-520 para expansión adicional. Después de la inoculación, la temperatura objetivo es 37 °C, y el pH se ajusta a un objetivo de 7,1 y se controla por adición de NaOH e introducción de CO₂. El oxígeno disuelto (DO) en el biorreactor se controla en un valor objetivo de un 40 % por introducción de aire y oxígeno. Una vez la densidad celular alcanza $\geq 2,6 \times 10^6$ células viables/ml después de aproximadamente 2-4 días, el cultivo se transfiere a un biorreactor de producción de 3000 l.

En ciertas realizaciones, se usa un llenado parcial de un biorreactor de producción de 3000 l para expandir adicionalmente el cultivo celular. Inicialmente, el reactor se carga con medio de cultivo (SR-520) y se inocula con el lote del reactor de semilla de 110 l. Durante esta etapa de llenado parcial, la temperatura, oxígeno disuelto y pH se controlan a 37 °C, 40 %, y 7,1, respectivamente. El pH del cultivo se controla por introducción de CO₂ y adición de NaOH. Por lo general, las células crecen durante 2-4 días después de alcanzar la densidad de etapa de producción de $\geq 1,6 \times 10^6$ células viables/ml.

Se añade medio de producción SR-521 (1950 l) al cultivo celular en el biorreactor de 3000 l para iniciar la etapa de producción. Se añade antiespumante C para disminuir la formación de espuma. El pH del cultivo se controla a un valor objetivo de 6,9 con conexión o desconexión de introducción de CO₂ y adición de NaOH. La temperatura y el oxígeno disuelto se controlan a valores objetivo de 35 °C y un 40 %, respectivamente. DO en el biorreactor se controla inicialmente al valor deseado por introducción de aire y se suplementa con oxígeno puro si fuera necesario. En ciertas realizaciones, la temperatura se disminuye a un valor objetivo de 33 °C cuando la densidad de células viables alcanza $\geq 3,0 \times 10^6$ células viables/ml, y pH y DO se mantienen en valores objetivo de 6,9 y un 40 %, respectivamente, mientras que, en otras realizaciones, se mantiene el valor objetivo de 35 °C. Se añade glucosa (SR-334) según necesidades. Los cultivos se recogen y purifican como se expone posteriormente cuando la viabilidad celular disminuye a ≤ 50 %.

4. Purificación de anticuerpos

4.1 Generalidades de la purificación de anticuerpos

La invención proporciona métodos para producir una preparación de anticuerpos purificada (o "reducida en HCP") a partir de una mezcla que comprende un anticuerpo y al menos un HCP. La presente invención también proporciona métodos en los que la preparación purificada final está reducida en Proteína A lixiviada. El proceso de purificación de la invención comienza en la etapa de separación cuando se ha producido el anticuerpo usando los métodos descritos anteriormente y métodos convencionales en la técnica. La Tabla 1 resume un caso de un esquema de purificación. Variaciones de este esquema que incluyen, pero no se limitan a, variaciones donde la etapa de cromatografía de afinidad a Proteína A se omite con el fin de que se inviertan las etapas de intercambio iónico, están previstas y se encuentran dentro del ámbito de la presente divulgación.

Tabla 1 Etapas de purificación con su fin asociado

| Etapas de purificación | Fin |
|--|---|
| Recuperación primaria | clarificado de la matriz de muestra |
| Cromatografía de afinidad | captura de anticuerpo, reducción de proteínas de célula hospedadora e impurezas asociadas |
| Incubación a pH bajo | reducción/inactivación viral |
| Cromatografía de intercambio aniónico | captura de anticuerpo, reducción de proteínas de célula hospedadora e impurezas asociadas |
| Cromatografía de interacción hidrófoba | reducción de agregados de anticuerpos y proteínas de célula hospedadora |
| Filtración viral | retirada de virus grandes, si estuvieran presentes |
| ultrafiltración/diafiltración | concentración e intercambio de tampón |
| Filtración final | anticuerpo concentrado y formulado |

Una vez se ha obtenido una solución o mezcla clarificada que comprende el anticuerpo, la separación del anticuerpo de las otras proteínas producidas por la célula, tales como las HCP, se lleva a cabo usando una combinación de diferentes técnicas de purificación, incluyendo una etapa o etapas de separación de intercambio iónico y una etapa o etapas de separación de interacción hidrófoba. Las etapas de separación separan mezclas de proteínas basándose

en su carga, grado de hidrofobicidad, o tamaño. En un aspecto de la divulgación, la separación se lleva a cabo usando cromatografía, incluyendo interacción catiónica, aniónica, e hidrófoba. Están disponibles varias resinas de cromatografía diferentes para cada una de estas técnicas, que permiten ajustar a medida de forma precisa el esquema de purificación para la proteína particular implicada. La esencia de cada uno de los métodos de separación es que se puede hacer que las proteínas atraviesen una columna a diferentes velocidades, consiguiendo una separación física que aumenta a medida que avanzan hacia abajo en la columna, o se adhieran selectivamente al medio de separación, eluyéndose de ese modo de forma diferencial con diferentes disolventes. En algunos casos, el anticuerpo se separa de las impurezas cuando las impurezas se adhieren específicamente a la columna y el anticuerpo no lo hace, es decir, el anticuerpo está presente en el flujo a través.

Como se ha indicado anteriormente, el ajuste a medida preciso de un esquema de purificación depende de la consideración de la proteína que se purifica. En ciertos casos, las etapas de separación de la presente divulgación se emplean para separar un anticuerpo de una o más HCP. Algunos anticuerpos que se pueden purificar con éxito usando los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos humanos IgA₁, IgA₂, IgD, IgE, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, e IgM. En ciertos casos, las estrategias de purificación de la presente divulgación excluyen el uso de cromatografía de afinidad a Proteína A, por ejemplo en el contexto de la purificación de anticuerpos IgG₃, dado que los anticuerpos IgG₃ se unen a Proteína A de forma ineficaz. Otros factores que permiten el ajuste a medida específico de un esquema de purificación incluyen, pero no se limitan a: la presencia o ausencia de una región Fc (por ejemplo, en el contexto de un anticuerpo de longitud completa en comparación con un fragmento Fab del mismo) debido a que la Proteína A se une a la región Fc; las secuencias de línea germinal particulares empleadas en la generación del anticuerpo de interés; y la composición de aminoácidos del anticuerpo (por ejemplo, la secuencia primaria del anticuerpo así como la carga global/hidrofobicidad de la molécula). Los anticuerpos que comparten una o más características se pueden purificar usando estrategias de purificación ajustadas a medida para beneficiarse de esa característica.

4.2 Recuperación primaria

Las etapas iniciales de los métodos de purificación de la presente invención implican la primera fase de clarificación y recuperación primaria del anticuerpo de una matriz de muestra. Además, el proceso de recuperación primaria también puede ser un punto en el que reducir o inactivar virus que pueden estar presentes en la matriz de muestra. Por ejemplo, se pueden usar uno cualquiera o más de una diversidad de métodos de reducción/inactivación viral durante la fase de recuperación primaria de purificación incluyendo inactivación térmica (pasteurización), inactivación por pH, tratamiento con disolvente/detergente, irradiación UV y con rayos γ y la adición de ciertos agentes químicos inactivantes tales como β -propiolactona o, por ejemplo, fenantrolina de cobre como en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.534.972. En ciertas realizaciones de la presente invención, la matriz de muestra se expone a reducción/inactivación viral por pH durante la fase de recuperación primaria.

Algunos métodos de reducción/inactivación viral por pH incluyen, pero no se limitan a, incubar la mezcla durante un período de tiempo a pH bajo, y posteriormente neutralizar el pH y retirar los materiales formados por partículas mediante filtración. En ciertos casos, la mezcla se incubará a un pH entre aproximadamente 2 y 5, a un pH entre aproximadamente 3 y 4, incluyendo, pero sin limitarse a, a un pH de aproximadamente 3,5. El pH de la mezcla de muestra se puede disminuir mediante cualquier ácido adecuado incluyendo, pero sin limitarse a, ácido cítrico, ácido acético, ácido caprílico, u otros ácidos adecuados. La selección del nivel de pH depende en gran medida del perfil de estabilidad del producto de anticuerpo y los componentes del tampón. Se conoce que la calidad del anticuerpo diana durante la reducción/inactivación de virus a pH bajo se ve afectada por el pH y la duración de la incubación a pH bajo. En ciertas realizaciones, la duración de la incubación a pH bajo será de 0,5 h a 2 h, incluyendo, pero sin limitarse a, de 0,5 h a 1,5 h, e incluyendo, pero sin limitarse a, duraciones de aproximadamente 1 h. La reducción/inactivación de virus depende de esos mismos parámetros además de la concentración de proteínas, que puede limitar la reducción/inactivación a altas concentraciones. De ese modo, se pueden seleccionar los parámetros apropiados de concentración de proteínas, pH, y duración de la reducción/inactivación para conseguir el nivel deseado de reducción/inactivación viral.

En ciertas realizaciones la reducción/inactivación viral se puede conseguir mediante el uso de filtros adecuados. Un ejemplo no limitante de un filtro adecuado es el filtro Ultipor DV50™ de Pall Corporation. Aunque ciertas realizaciones de la presente invención emplean tal filtración durante la fase de recuperación primaria, en otras realizaciones se emplea en otras fases del proceso de purificación, incluyendo como penúltima etapa o bien como etapa final de la purificación. En ciertas realizaciones, se emplean filtros alternativos para reducción/inactivación viral, tales como, pero no limitados a, filtros Viresolve™ (Millipore, Billerica, Mass.); filtros Zeta Plus VR™ (CUNO; Meriden, Conn.); y filtros Planova™ (Asahi Kasei Pharma, Planova Division, Buffalo Grove, Ill.).

En las realizaciones en donde se emplea reducción/inactivación viral, la mezcla de muestra se puede ajustar, según sea necesario, para etapas de purificación adicionales. Por ejemplo, después de la reducción/inactivación viral a pH bajo, el pH de la mezcla de muestra se ajusta por lo general a un pH más neutro, por ejemplo, de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8,5, e incluyendo, pero sin limitarse a, aproximadamente 4,9, antes de continuar el proceso de purificación. Además, la mezcla se puede lavar abundantemente con agua para inyección (WFI) para obtener una conductividad deseada.

En ciertas realizaciones, la recuperación primaria incluirá una o más etapas de centrifugación para clarificar adicionalmente la matriz de muestra y de ese modo ayudar en la purificación de los anticuerpos anti-IL-13. La centrifugación de la muestra se puede realizar, por ejemplo, pero no a modo de limitación, de 7.000 x g a aproximadamente 12.750 x g. En el contexto de la purificación a gran escala, tal centrifugación se puede producir en línea con un caudal que se establece para conseguir, por ejemplo, pero no a modo de limitación, un nivel de turbidez de 150 NTU en el sobrenadante resultante. A continuación, tal sobrenadante se puede recoger para purificación adicional.

En ciertas realizaciones, la recuperación primaria incluirá el uso de una o más etapas de filtración en lecho profundo para clarificar adicionalmente la matriz de muestra y de ese modo ayudar en la purificación de los anticuerpos de la presente divulgación. Los filtros de lecho profundo contienen medios de filtración que tienen una densidad graduada. Tal densidad graduada permite que queden atrapadas partículas de mayor tamaño cerca de la superficie del filtro mientras que las partículas de menor tamaño penetran las mayores áreas abiertas en la superficie del filtro, quedando atrapadas únicamente en las menores aberturas más cerca del centro del filtro. En ciertas realizaciones, la etapa de filtración en lecho profundo puede ser una etapa de filtración en lecho profundo Delipid. Aunque ciertas realizaciones emplean etapas de filtración en lecho profundo solo durante la fase de recuperación primaria, otras realizaciones emplean filtros de lecho profundo, incluyendo filtros de lecho profundo Delipid, durante una o más fases adicionales de la purificación. Algunos ejemplos no limitantes de filtros de lecho profundo que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen los filtros de lecho profundo de Cuno™ modelo 30/60ZA (3M Corp.), y los cartuchos de filtro de doble capa de Sartopore™ de 0,45/0,2 µm.

4.3 Cromatografía de afinidad

En ciertos casos, la muestra de recuperación primaria se somete a cromatografía de afinidad para purificar adicionalmente el anticuerpo de interés de las HCP. En ciertos casos, el material cromatográfico es capaz de unirse selectiva o específicamente al anticuerpo de interés. Algunos ejemplos no limitantes de tal material cromatográfico incluyen: Proteína A, Proteína G, material cromatográfico que comprende el antígeno al que se une el anticuerpo de interés, y material cromatográfico que comprende una proteína de unión a Fc. En realizaciones específicas, la etapa de cromatografía de afinidad implica someter la muestra de recuperación primaria a una columna que comprende una resina de Proteína A adecuada. La resina de Proteína A es útil para purificación y aislamiento por afinidad de una diversidad de isotipos de anticuerpo, en particular IgG₁, IgG₂, e IgG₄. La Proteína A es una proteína de la pared celular bacteriana que se une a las IgG de mamífero principalmente a través de sus regiones Fc. En su estado nativo, la Proteína A tiene cinco dominios de unión a IgG así como otros dominios de función desconocida.

Existen varias fuentes comerciales de resina de Proteína A. Algunas resinas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, MabSelect™ de GE Healthcare y ProSep Ultra Plus™ de Millipore. Un ejemplo no limitante de una columna adecuada empaquetada con MabSelect™ es una columna de aproximadamente 1,0 cm de diámetro x aproximadamente 21,6 cm de longitud (volumen de lecho de ~17 ml). Este tamaño de columna se puede usar para purificaciones a pequeña escala y se puede comparar con otras columnas usadas a escala superior. Por ejemplo, se puede usar una columna de 20 cm x 21 cm cuyo volumen de lecho es aproximadamente 6,6 l para purificaciones a mayor escala. Independientemente de la columna, se puede empaquetar la columna usando una resina adecuada tal como MabSelect™ o ProSep Ultra Plus™.

En ciertas realizaciones, será ventajoso identificar la capacidad de unión dinámica (DBC) de la resina de Proteína A con el fin de ajustar a medida la purificación al anticuerpo particular de interés. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, DBC de una columna de MabSelect™ o ProSept Ultra Plus™ se puede determinar mediante una carga de caudal individual o una estrategia de carga de flujo doble. La carga de caudal individual se puede evaluar a una velocidad de aproximadamente 300 cm/h durante el período de carga completo. La estrategia de carga de caudal doble se puede determinar por carga de la columna con hasta aproximadamente 35 mg de proteína/ml de resina a una velocidad lineal de aproximadamente 300 cm/h, y a continuación reduciendo la velocidad lineal a la mitad para permitir un mayor tiempo de residencia de la última parte de la carga.

En ciertas realizaciones, la columna de Proteína A se puede equilibrar con un tampón adecuado antes de la carga de la muestra. Un ejemplo no limitante de un tampón adecuado es un tampón de Tris/NaCl, a pH de aproximadamente 7,2. Un ejemplo no limitante de condiciones de equilibrado adecuadas es Tris 25 mM, NaCl 100 mM, a un pH de aproximadamente 7,2. Después de este equilibrado, la muestra se puede cargar en la columna. Después de la carga de la columna, la columna se puede lavar una o múltiples veces usando, por ejemplo, el tampón de equilibrado. Se pueden emplear otros lavados, incluyendo lavados que empleen tampones diferentes, antes de la elución de la columna. Por ejemplo, la columna se puede lavar usando uno o más volúmenes de columna de ácido cítrico/citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M a un pH de aproximadamente 6,0. Este lavado puede ir seguido opcionalmente por uno o más lavados que usen el tampón de equilibrado. A continuación, la columna de Proteína A se puede eluir usando un tampón de elución apropiado. Un ejemplo no limitante de un tampón de elución adecuado es un tampón de ácido acético/NaCl, a pH de aproximadamente 3,5. Las condiciones adecuadas son, por ejemplo, ácido acético 0,1 M, a un pH de aproximadamente 3,5. El eluato se puede monitorizar usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede seguir la absorbancia a DO₂₈₀. El eluato de la

columna se puede recoger empezando con una desviación inicial de aproximadamente 0,5 AU hasta una lectura de aproximadamente 0,5 AU en el borde posterior del pico de elución. A continuación, la fracción o fracciones de elución de interés se pueden preparar para procesamiento adicional. Por ejemplo, la muestra recogida se puede valorar a un pH de aproximadamente 5,0 usando Tris (por ejemplo, 1,0 M) a un pH de aproximadamente 10. Opcionalmente, esta muestra valorada se puede filtrar y procesar adicionalmente.

4.4 Cromatografía de intercambio iónico

En ciertos casos, la presente invención proporciona métodos para producir una preparación de anticuerpo reducida en HCP a partir de una mezcla que comprende un anticuerpo y al menos una HCP sometiendo la mezcla a al menos una etapa de separación de intercambio iónico de un modo tal que se obtiene un eluato que comprende el anticuerpo. La separación de intercambio iónico incluye cualquier método mediante el que se separen dos sustancias basándose en la diferencia de sus respectivas cargas iónicas, y puede emplear cualquier material de intercambio catiónico o material de intercambio aniónico.

El uso de un material de intercambio catiónico frente a un material de intercambio aniónico se basa en la carga global de la proteína. Por lo tanto, está dentro del ámbito de la presente invención emplear una etapa de intercambio aniónico antes del uso de una etapa de intercambio catiónico, o una etapa de intercambio catiónico antes del uso de una etapa de intercambio aniónico. Además, está dentro del ámbito de la presente divulgación emplear solo una etapa de intercambio catiónico, solo una etapa de intercambio aniónico, o cualquier combinación seriada de las dos.

En la realización de la separación, la mezcla inicial de anticuerpos se puede poner en contacto con el material de intercambio iónico usando cualquiera de una diversidad de técnicas, por ejemplo, usando una técnica de purificación discontinua o una técnica cromatográfica.

Por ejemplo, en el contexto de una purificación discontinua, se prepara el material de intercambio iónico en, o equilibrado con, el tampón de partida deseado. Después de la preparación, o equilibrado, se obtiene una suspensión del material de intercambio iónico. La solución de anticuerpo se pone en contacto con la suspensión para adsorber el anticuerpo que se separa en el material de intercambio iónico. La solución que comprende la proteína o proteínas HCP que no se unen al material de intercambio iónico se separa de la suspensión, por ejemplo, permitiendo que la suspensión sedimente y retirando el sobrenadante. La suspensión se puede someter a una o más etapas de lavado. Si se desea, la suspensión se puede poner en contacto con una solución de mayor conductividad para desorber las HCP que se hayan unido al material de intercambio iónico. Con el fin de eluir polipéptidos unidos, se puede aumentar la concentración salina del tampón.

También se puede usar la cromatografía de intercambio iónico como técnica de separación de intercambio iónico; la cromatografía de intercambio iónico separa moléculas basándose en diferencias entre la carga global de las moléculas. Para la purificación de un anticuerpo, el anticuerpo debe tener una carga opuesta a la del grupo funcional unido al material de intercambio iónico, por ejemplo, resina, con el fin de unirse. Por ejemplo, los anticuerpos, que generalmente tienen una carga global positiva a un pH de tampón por debajo de su pI, se unirán bien a material de intercambio catiónico, que contiene grupos funcionales cargados negativamente.

En cromatografía de intercambio iónico, los fragmentos cargados en la superficie del soluto son atraídos por las cargas opuestas unidas a la matriz de cromatografía, siempre que la fuerza iónica del tampón circundante sea baja. La elución se consigue generalmente por aumento de la fuerza iónica (es decir, la conductividad) del tampón que compite con el soluto por los sitios cargados de la matriz de intercambio iónico. Cambiar el pH y por lo tanto alterar la carga del soluto es otra forma de conseguir la elución del soluto. El cambio en la conductividad o el pH puede ser gradual (elución en gradiente) o por etapas (elución por etapas).

Los sustituyentes aniónicos o catiónicos pueden estar unidos a matrices con el fin de formar soportes aniónicos o catiónicos para cromatografía. Algunos ejemplos no limitantes de sustituyentes de intercambio aniónico incluyen grupos dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amina cuaternaria (Q). Algunos sustituyentes catiónicos incluyen carboximetilo (CM), sulfoetilo (SE), sulfopropilo (SP), fosfato (P) y sulfonato (S). Las resinas de intercambio iónico de celulosa tales como DE23™, DE32™, DE52™, CM-23™, CM-32™, y CM-52™ están disponibles en Whatman Ltd. Maidstone, Kent, U.K. También se conocen intercambiadores iónicos reticulados y basados en SEPHADEX®. Por ejemplo, DEAE-, QAE-, CM-, y SP-SEPHADEX® y DEAE-, Q-, CM- y S-SLPHAROSE® y alto flujo de SEPHAROSE® están todos disponibles en Pharmacia AB. Además, copolímero de etilenglicol-metacrilato derivatizado tanto con DEAE como con CM tal como TOYOPEARL™ DEAE-650S o M y TOYOPEARL™ CM-650S o Mare disponible en Toso Haas Co., Philadelphia, Pa. En ciertas realizaciones, se lleva a cabo una etapa de intercambio aniónico usando un cartucho de membrana Pall Mustang Q.

Una mezcla que comprende un anticuerpo e impurezas, por ejemplo, HCP, se carga en una columna de intercambio iónico, tal como una columna de intercambio catiónico. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, la mezcla se puede cargar con una carga de aproximadamente 80 g de proteína/l de resina dependiendo de la columna usada. Un ejemplo de una columna de intercambio catiónico adecuada es una columna de 80 cm de diámetro y 23 cm de longitud cuyo volumen de lecho es aproximadamente 116 l. La mezcla cargada en esta columna catiónica se puede

lavar posteriormente con tampón de lavado (tampón de equilibrado). A continuación, el anticuerpo se eluye de la columna, y se obtiene un primer eluato.

Esta etapa de intercambio iónico facilita la captura del anticuerpo de interés mientras que reduce impurezas tales como las HCP. En ciertos aspectos, la columna de intercambio iónico es una columna de intercambio catiónico. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, una resina adecuada para tal columna de intercambio catiónico es la resina CM HyperDF™. Estas resinas están disponibles en fuentes comerciales tales como Pall Corporation. Este procedimiento de intercambio catiónico se puede llevar a cabo a, o aproximadamente a, temperatura ambiente.

4.5 Ultrafiltración/diafiltración

Ciertas realizaciones de la presente invención emplean etapas de ultrafiltración y/o diafiltración para purificar adicionalmente y concentrar la muestra de anticuerpo. La ultrafiltración se describe con detalle en: Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications, L. Zeman y A. Zydney (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1996); y en: Ultrafiltration Handbook, Munir Cheryan (Technomic Publishing, 1986; n.º ISBN 87762-456-9). Un proceso de filtración es la filtración de flujo tangencial que se describe en el catálogo de Millipore titulado "Pharmaceutical Process Filtration Catalogue", pág. 177-202 (Bedford, Mass., 1995/96). Generalmente, se considera que ultrafiltración se refiere a la filtración que usa filtros con un tamaño de poro menor de 0,1 µm. Empleando filtros que tienen tal tamaño de poro pequeño, el volumen de la muestra se puede reducir mediante permeación del tampón de muestra a través del filtro mientras que los anticuerpos quedan retenidos detrás del filtro.

La diafiltración es un método de uso de ultrafiltros para retirar e intercambiar sales, azúcares, y disolventes no acuosos, separar las especies libres de las unidas, retirar material de bajo peso molecular, y/o causar un cambio rápido de los entornos iónico y/o de pH. Se retiran microsolutos de la forma más eficaz añadiendo disolvente a la solución que se ultrafiltra a una velocidad aproximadamente igual a la velocidad de ultrafiltración. Esto lava las microespecies de la solución a un volumen constante, purificando de forma eficaz el anticuerpo retenido. En ciertas realizaciones de la presente invención, se emplea una etapa de diafiltración para intercambiar los diversos tampones usados en relación con la presente invención, opcionalmente antes de cromatografía adicional u otras etapas de purificación, así como para retirar impurezas de las preparaciones de anticuerpo.

4.6 Cromatografía de interacción hidrófoba

La presente divulgación también presenta métodos para producir una preparación de anticuerpo reducida en HCP a partir de una mezcla que comprende un anticuerpo y al menos una HCP, que comprenden además una etapa de separación de interacción hidrófoba. Por ejemplo, un primer eluato obtenido de una columna de intercambio iónico se puede someter a un material de interacción hidrófoba de un modo tal que se obtenga un segundo eluato que tiene un nivel reducido de HCP. Las etapas de cromatografía de interacción hidrófoba, tales como las que se desvelan en el presente documento, se llevan a cabo generalmente para retirar agregados de proteínas, tales como agregados de anticuerpos, e impurezas relacionadas con el proceso.

En la realización de la separación, la mezcla de muestra se pone en contacto con el material de HIC, por ejemplo, usando una técnica de purificación discontinua o usando una columna. Antes de la purificación por HIC, puede ser deseable retirar cualquier agente caotrópico o sustancia muy hidrófoba, por ejemplo, haciendo pasar la mezcla a través de una precolumna.

Por ejemplo, en el contexto de la purificación discontinua, el material de HIC se prepara en, o se equilibra con, el tampón de equilibrado deseado. Se obtiene una suspensión del material de HIC. La solución de anticuerpo se pone en contacto con la suspensión para adsorber el anticuerpo que se separa sobre el material de HIC. La solución que comprende las HCP que no se unen al material de HIC se separa de la suspensión, por ejemplo, permitiendo que la suspensión sedimente y retirando el sobrenadante. La suspensión se puede someter a una o más etapas de lavado. Si se desea, la suspensión se puede poner en contacto con una solución de conductividad inferior para desorber los anticuerpos que se hayan unido al material de HIC. Con el fin de eluir los anticuerpos unidos, se puede disminuir la concentración salina.

Mientras que la cromatografía de intercambio iónico depende de las cargas de los anticuerpos para aislarlos, la cromatografía de interacción hidrófoba usa las propiedades hidrófobas de los anticuerpos. Los grupos hidrófobos de los anticuerpos interactúan con los grupos hidrófobos de la columna. Cuanto más hidrófoba es una proteína, con mayor fuerza interactuará con la columna. De ese modo, la etapa de HIC retira impurezas procedentes de la célula hospedadora (por ejemplo, ADN y otras especies relacionadas con el producto de alto y bajo peso molecular).

Las interacciones hidrófobas son más fuertes a mayor fuerza iónica y, por lo tanto, esta forma de separación se lleva a cabo convenientemente después de precipitaciones salinas o procedimientos de intercambio iónico. La adsorción del anticuerpo sobre una columna de HIC está favorecida por altas concentraciones salinas, pero las concentraciones reales pueden variar en un amplio intervalo dependiendo de la naturaleza del anticuerpo y el ligando de HIC particular seleccionado. Se pueden disponer diversos iones en la denominada serie solubílica dependiendo de si promueven interacciones hidrófobas (efectos de precipitación salina) o alteran la estructura del

agua (efecto caotrópico) y conducen a la debilitación de la interacción hidrófoba. Los cationes se clasifican, en términos de aumentar el efecto de precipitación salina, como Ba⁺⁺; Ca⁺⁺; Mg⁺⁺; Li⁺; Cs⁺; Na⁺; K⁺; Rb⁺; NH₄⁺, mientras que los aniones se pueden clasificar, en términos de aumentar el efecto caotrópico, como PO⁻⁻⁻; SO₄⁻⁻⁻; CH₃CO₃⁻; Cl⁻; Br⁻; NO₃⁻; ClO₄⁻; I⁻; SCN⁻.

En general, los sulfatos de Na, K o NH₄ promueven de forma eficaz la interacción ligando-proteína en HIC. Se pueden formular sales cuya influencia en la fuerza de la interacción viene dada por la siguiente relación: (NH₄)₂SO₄ > Na₂SO₄ > NaCl > NH₄Cl > NaBr > NaSCN. En general, son útiles las concentraciones salinas de sulfato de amonio entre aproximadamente 0,75 y aproximadamente 2 M y de NaCl entre aproximadamente 1 y 4 M.

Las columnas de HIC comprenden normalmente una matriz base (por ejemplo, material reticulado de agarosa o copolímero sintético) a la que se acoplan ligandos hidrófobos (por ejemplo, grupos alquilo o arilo). Una columna de HIC adecuada comprende una resina de agarosa sustituida con grupos fenilo (por ejemplo, una columna de Fenil Sepharose™). Están disponibles en el mercado numerosas columnas de HIC. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, columna de alto flujo 6 de Fenil Sepharose™ con alta o baja sustitución (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); columna de alto rendimiento de Fenil Sepharose™ (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); columna de alto rendimiento de Octil Sepharose™ (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); columnas de Propil EMD Fractogel™ o Fenil EMD Fractogel™ (E. Merck, Alemania); soportes de metil Macro-Prep™ o t-Butil Macro-Prep™ (Bio-Rad, California); columna WP HI-Propil (C3)™ (J. T. Baker, New Jersey); y columnas de Éter, Fenil, o Butil Toyopearl™ (TosoHaas, PA).

4.7 Estrategias de purificación a modo de ejemplo

En ciertas realizaciones, la recuperación primaria transcurre empleando inicialmente etapas de centrifugación y filtración para retirar células y residuos celulares (incluyendo las HCP) de la recolección del biorreactor de producción. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un cultivo que comprende anticuerpos, medio, y células se puede someter a una centrifugación de aproximadamente 7.000 x g a aproximadamente 11.000 x g. En ciertas realizaciones, el sobrenadante de la muestra resultante se hace pasar a continuación a través de un tren de filtros que comprende múltiples filtros de lecho profundo. En ciertas realizaciones, el tren de filtros comprende aproximadamente doce filtros de lecho profundo Cuno™ modelo 30/60ZA de 16 pulgadas (3M Corp.) y aproximadamente tres alojamientos de filtro redondos equipados con tres cartuchos de filtro Sartopore™ 2 de 0,45/0,2 μm y 30 pulgadas (Sartorius). El sobrenadante clarificado se recoge en un vaso tal como un vaso de recogida preesterilizado y se mantiene a aproximadamente 8 °C. A continuación, esta temperatura se ajusta a aproximadamente 20 °C antes de la etapa o etapas de cromatografía de captura indicadas posteriormente. Se ha de observar que el experto en la materia puede variar las condiciones enumeradas anteriormente y aún pueden estar dentro del ámbito de la presente invención.

La recuperación primaria irá seguida de cromatografía de afinidad usando resina de Proteína A. Existen varias fuentes comerciales para la resina de Proteína A. Una resina adecuada es MabSelect™ de GE Healthcare. Un ejemplo de una columna adecuada empaquetada con MabSelect™ es una columna de aproximadamente 1,0 cm de diámetro x aproximadamente 21,6 cm de longitud (volumen de lecho de ~17 ml). Este tamaño de columna se puede usar para escala de pruebas. Esto se puede comparar con otras columnas usadas a una escala superior. Por ejemplo, una columna de 20 cm x 21 cm cuyo volumen de lecho es aproximadamente 6,6 l se puede usar para producción comercial. Independientemente de la columna, la columna se puede empaquetar usando una resina adecuada tal como MabSelect™.

En ciertos aspectos, la columna de Proteína A se puede equilibrar con un tampón adecuado antes de cargar la muestra. Un ejemplo de un tampón adecuado es un tampón de Tris/NaCl, a un pH de aproximadamente 6 a 8, incluyendo, pero sin limitarse a, aproximadamente 7,2. Un ejemplo de condiciones adecuadas es Tris 25 mM, NaCl 100 mM, a un pH de 7,2. Después de este equilibrado, la muestra se puede cargar en la columna. Después de la carga de la columna, la columna se puede lavar una o múltiples veces usando, por ejemplo, el tampón de equilibrado. Se pueden usar otros lavados incluyendo lavados que empleen diferentes tampones antes de eluir la columna. Por ejemplo, la columna se puede lavar usando uno o más volúmenes de columna de ácido cítrico/citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M a un pH de aproximadamente 6,0. Este lavado puede ir seguido opcionalmente de uno o más lavados usando el tampón de equilibrado. La columna de Proteína A se puede eluir a continuación usando un tampón de elución adecuado. Un ejemplo de un tampón de elución adecuado es un tampón de ácido acético/NaCl, a un pH de aproximadamente 3,5. Algunas condiciones adecuadas son, por ejemplo, ácido acético 0,1 M, a un pH de 3,5. El eluato se puede monitorizar usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede seguir la absorbancia a DO₂₈₀. El eluato de la columna se puede recoger comenzando con una desviación inicial de aproximadamente 0,5 AU hasta una lectura de aproximadamente 0,5 AU en el borde posterior del pico de elución. La fracción o fracciones de elución de interés se pueden preparar a continuación para procesamiento adicional. Por ejemplo, la muestra recogida se puede valorar a un pH de aproximadamente 5,0 usando Tris (por ejemplo, 1,0 M) a un pH de aproximadamente 10. Opcionalmente, esta muestra valorada se puede filtrar y procesar adicionalmente.

La capacidad de unión dinámica (DBC) de la columna de MabSelect™ se puede determinar mediante cualquiera de

una estrategia de carga de caudal individual o carga de flujo doble. La carga de caudal individual se puede evaluar a una velocidad de aproximadamente 300 cm/h durante el período de carga completo. La estrategia de carga de caudal doble se puede determinar cargando la columna hasta aproximadamente 35 mg de proteína/ml de resina a una velocidad lineal de aproximadamente 300 cm/h, y a continuación reduciendo la velocidad lineal a la mitad para permitir un mayor tiempo de residencia durante la última parte de la carga.

A continuación, el eluato de Proteína A se puede purificar adicionalmente empleando una etapa de reducción/inactivación de virus mediada por pH. En ciertos casos, esta etapa implicará ajustar el pH del eluato entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, incluyendo, pero sin limitarse a, aproximadamente 3,5, durante aproximadamente 1 hora. La reducción de pH se puede facilitar usando preparaciones ácidas tales como ácido cítrico, por ejemplo, ácido cítrico 3 M. La exposición al pH ácido reduce, si no elimina completamente, los contaminantes virales sensibles al pH y precipita cierta cantidad de contaminantes del medio/celulares. Después de esta etapa de reducción/inactivación, el pH se ajusta a aproximadamente 4,9 o 5,0 usando una base tal como hidróxido de sodio, por ejemplo, hidróxido de sodio 3 M, durante aproximadamente veinte a aproximadamente cuarenta minutos. Este ajuste se puede producir a aproximadamente 20 °C.

En ciertas realizaciones, el cultivo de pH ajustado se purificó adicionalmente usando una columna de intercambio aniónico. Un ejemplo no limitante de una columna adecuada para esta etapa es una columna de 60 cm de diámetro x 30 cm de longitud cuyo volumen de lecho es aproximadamente 85 l. La columna está empaquetada con una resina de intercambio aniónico, tal como Q Sepharose™ de flujo rápido de GE Healthcare. La columna se puede equilibrar usando aproximadamente siete volúmenes de columna de un tampón apropiado tal como Tris/cloruro de sodio. Un ejemplo de condiciones adecuadas son Tris 25 mM, cloruro de sodio 50 mM a un pH de 8,0. El experto en la materia puede variar las condiciones pero aún estar dentro del ámbito de la presente invención. La columna se carga con la muestra recogida de la etapa de purificación de Proteína A indicada anteriormente. En otro aspecto, la columna se carga a partir del eluato recogido durante el intercambio catiónico. Después de la carga de la columna, la columna se lava con el tampón de equilibrado (por ejemplo, el tampón de Tris/cloruro de sodio). El flujo a través que comprende los anticuerpos se puede monitorizar usando un espectrofotómetro UV a DO_{280 nm}. Esta etapa de intercambio aniónico reduce las impurezas relacionadas con el proceso tales como ácidos nucleicos como ADN, y las proteínas de la célula hospedadora. La separación se produce debido al hecho de que los anticuerpos de interés no interactúan sustancialmente con ni se unen a la fase sólida de la columna, por ejemplo, a la Q Sepharose™, pero numerosas impurezas interactúan con y se unen a la fase sólida de la columna. El intercambio aniónico se puede llevar a cabo a aproximadamente 12 °C.

En ciertos casos, el cultivo de pH ajustado se purifica a continuación adicionalmente usando una columna de intercambio catiónico. En ciertos casos, el tampón de equilibrado usado en la columna de intercambio catiónico es un tampón que tiene un pH de aproximadamente 5,0. Un ejemplo de un tampón adecuado es acetato de sodio aproximadamente 210 mM, a un pH de 5,0. Después del equilibrado, la columna se carga con la muestra preparada de la etapa de recuperación primaria anterior. La columna se empaqueta con una resina de intercambio catiónico, tal como CM Sepharose™ de flujo rápido de GE Healthcare. A continuación, la columna se lava usando el tampón de equilibrado. Después, la columna se somete a una etapa de elución usando un tampón que tiene una mayor fuerza iónica en comparación con el tampón de equilibrado o de lavado. Por ejemplo, el tampón de elución adecuado puede ser acetato de sodio aproximadamente 790 mM, a un pH de 5,0. Los anticuerpos se eluirán y se puede monitorizar usando un espectrofotómetro UV a DO_{280 nm}. En un ejemplo particular, la recogida por elución puede ser de más de 3 DO_{280 nm} a menos de 8 DO_{280 nm}. Se ha de entender que el experto en la materia puede variar las condiciones y aún estar dentro del ámbito de la divulgación.

En ciertos casos, el cultivo de pH ajustado, el eluato de intercambio catiónico, o el eluato de intercambio aniónico, se filtra usando, por ejemplo, un filtro Delipid Cuno™ de 16 pulgadas. Esta filtración, usando el filtro Delipid, se puede seguir, por ejemplo, mediante un cartucho de filtro de doble capa Sartopore™ de 0,45/0,2 μm y 30 pulgadas. El tampón de elución de intercambio iónico se puede usar para lavar abundantemente el volumen residual remanente en los filtros y prepararlos para ultrafiltración/diafiltración.

Con el fin de llevar a cabo la etapa de ultrafiltración/diafiltración, el medio de filtración se prepara en un tampón adecuado, por ejemplo, fosfato de sodio 20 mM, a un pH de 7,0. Se puede añadir una sal tal como cloruro de sodio para aumentar la fuerza iónica, por ejemplo, cloruro de sodio 100 mM. Esta etapa de ultrafiltración/diafiltración sirve para concentrar los anticuerpos anti-IL-13, retirar el acetato de sodio y ajustar el pH. Están disponibles filtros comerciales para efectuar esta etapa. Por ejemplo, Millipore fabrica un casete de membrana de ultrafiltro de celulosa de corte de peso molecular (MWCO) de 30 kD. Este procedimiento de filtración se puede llevar a cabo a o aproximadamente a temperatura ambiente.

En ciertas realizaciones, la muestra de la etapa de filtración de captura anterior se somete a una segunda etapa de separación de intercambio iónico. Esta segunda separación de intercambio iónico implicará, en ciertas realizaciones, una separación basada en la carga opuesta a la primera separación de intercambio iónico. Por ejemplo, si se emplea una etapa de intercambio aniónico después de la recuperación primaria, la segunda etapa cromatográfica de intercambio iónico puede ser una etapa de intercambio catiónico. Por el contrario, si la etapa de recuperación primaria va seguida de una etapa de intercambio catiónico, esa etapa iría seguida de una etapa de intercambio

aniónico. En ciertas realizaciones, el primer eluato de intercambio iónico se puede someter directamente a la segunda etapa cromatográfica de intercambio iónico donde el primer eluato de intercambio iónico se ajusta a las condiciones de tampón apropiadas. Los materiales de separación aniónicos y catiónicos adecuados y las condiciones se han descrito anteriormente.

La muestra que contiene anticuerpos se procesará adicionalmente usando una etapa de separación de interacción hidrófoba. Un ejemplo no limitante de una columna adecuada para tal etapa es una columna de 80 cm de diámetro x 15 cm de longitud cuyo volumen de lecho es aproximadamente 75 l, que está empaquetada con una resina apropiada usada para HIC tal como, pero no limitada a, Fenil HP Sepharose™ de Amersham Biosciences, Upsala, Suecia. La preparación de flujo a través obtenida a partir de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico previa que comprende los anticuerpos de interés se puede diluir con un volumen igual de sulfato de amonio aproximadamente 1,7 M, fosfato de sodio 50 mM, a un pH de 7,0. A continuación, esto se puede someter a filtración usando un filtro de doble capa Sartopore™ 2 de 0,45/0,2 µm, o su equivalente. En ciertas realizaciones, el procedimiento de cromatografía hidrófoba implica dos o más ciclos.

En ciertas realizaciones, la columna de HIC se equilibra en primer lugar usando un tampón adecuado. Un ejemplo no limitante de un tampón adecuado es sulfato de amonio 0,85 M, fosfato de sodio 50 mM, a un pH de 7,0. El experto en la materia puede variar el tampón de equilibrado y aún estar dentro del ámbito de la presente invención alterando las concentraciones de los agentes de tamponamiento y/o sustituyendo tampones equivalentes. En ciertas realizaciones, la columna se carga a continuación con una muestra de flujo a través de intercambio aniónico y se lava múltiples veces, por ejemplo, tres veces, con un sistema tamponador apropiado tal como sulfato de amonio/fosfato de sodio. Un ejemplo de un sistema tamponador adecuado incluye tampón de sulfato de amonio 1,1 M, fosfato de sodio 50 mM con un pH de aproximadamente 7,0. Opcionalmente, la columna puede experimentar ciclos de lavado adicionales. Por ejemplo, un segundo ciclo de lavado puede incluir múltiples lavados de columna, por ejemplo, de una a siete veces, usando un sistema tamponador apropiado. Un ejemplo no limitante de sistema tamponador adecuado incluye sulfato de amonio 0,85 M, fosfato de sodio 50 mM, a un pH de 7,0. En un aspecto, la columna cargada experimenta aún un tercer lavado usando un sistema tamponador apropiado. La columna se puede lavar múltiples veces, por ejemplo, de una a tres veces, usando un sistema tamponador tal como sulfato de amonio 1,1 M, fosfato de sodio 50 mM a un pH de aproximadamente 7,0. De nuevo, el experto en la materia puede variar las condiciones de tamponamiento y aún estar dentro del ámbito de la presente invención.

La columna se eluye usando un tampón de elución apropiado. Un ejemplo adecuado de tal tampón de elución es sulfato de amonio 0,5 M, fosfato de sodio 15 mM a un pH de aproximadamente 7,0. Los anticuerpos de interés se pueden detectar y recoger usando un espectrofotómetro convencional de más de 3 DO_{280 nm} a inferior al pico a 3 DO_{280 nm}.

En ciertos aspectos de la invención, el eluato de la etapa de cromatografía hidrófoba se somete a filtración para la retirada de partículas virales, incluyendo virus intactos, si estuvieran presentes. Un ejemplo no limitante de un filtro adecuado es el filtro Ultipor DV50™ de Pall Corporation. Se pueden usar otros filtros virales en esta etapa de filtración y son bien conocidos por los expertos en la materia. El eluato de HIC se hace pasar a través de un filtro prehumedecido de aproximadamente 0,1 µm y un tren de 2 x filtros Ultipor DV50™ de 30 pulgadas a aproximadamente 34 psig. En ciertas realizaciones, después del proceso de filtración, el filtro se lava usando, por ejemplo, un tampón de elución de HIC con el fin de retirar cualquier anticuerpo retenido en el alojamiento del filtro. El filtrado se puede almacenar en un recipiente preesterilizado a aproximadamente 12 °C.

En ciertas realizaciones, el filtrado anterior se somete de nuevo a ultrafiltración/diafiltración; esta etapa es importante si el cometido final del profesional sanitario es usar el anticuerpo, por ejemplo, en una formulación farmacéutica. Este proceso, si se emplea, puede facilitar la concentración del anticuerpo, la retirada de las sales de tamponamiento usadas previamente y el reemplazo de las mismas con un tampón de formulación particular. En ciertas realizaciones, se lleva a cabo diafiltración continua con múltiples volúmenes, por ejemplo, dos volúmenes, de un tampón de formulación. Un ejemplo no limitante de un tampón de formulación adecuado es un tampón de metionina 5 mM, manitol al 2 %, sacarosa al 0,5 %, a un pH de 5,9 (sin Tween). Después de la finalización de este intercambio de diavolumen, los anticuerpos se concentran. Una vez se ha conseguido una concentración predeterminada de anticuerpo, entonces el profesional sanitario puede calcular una cantidad de un 10 % de Tween que se debería añadir para llegar a una concentración final de Tween de aproximadamente un 0,005 % (v/v).

Ciertas realizaciones de la presente invención incluirán etapas de purificación adicionales. Algunos ejemplos de procedimientos de purificación adicionales que se pueden llevar a cabo antes de, durante, o después del método de cromatografía de intercambio iónico incluyen precipitación con etanol, enfoque isoeléctrico, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina Sepharose™, cromatografía de intercambio aniónico adicional y/o cromatografía de intercambio catiónico adicional, cromatoenfoco, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en hidroxiapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína G, un anticuerpo, un sustrato específico, ligando o antígeno como reactivo de captura).

En ciertos casos de la presente divulgación, el anticuerpo anti-IL-13 es un anticuerpo del isotipo IgA₁, IgA₂, IgD, IgE, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, o IgM que comprende las secuencias de regiones variables de cadena pesada y ligera

indicadas en la Figura 1. En ciertos casos, el anticuerpo anti-IL-13 es un anticuerpo del isotipo IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄ que comprende las secuencias de regiones variables de cadena pesada y ligera perfiladas en la Figura 1.

5. Métodos para someter a ensayo la pureza de la muestra

5.1 Ensayo de proteínas de la célula hospedadora

La presente divulgación también proporciona métodos para determinar los niveles residuales de concentración de proteínas de célula hospedadora (HCP) en la composición de anticuerpo aislada/purificada. Como se ha descrito anteriormente, las HCP se excluyen deseablemente del producto de sustancia diana final, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13. Algunas HCP a modo de ejemplo incluyen proteínas que se originan en la fuente de la producción de anticuerpo. El fracaso en identificar y retirar suficientemente las HCP del anticuerpo diana puede conducir a una eficacia reducida y/o reacciones adversas en el sujeto.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ELISA de HCP" se refiere a un ELISA donde el segundo anticuerpo usado en el ensayo es específico frente a las HCP producidas en las células, por ejemplo, células CHO, usadas para generar el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-IL-13). El segundo anticuerpo se puede producir de acuerdo con métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el segundo anticuerpo se puede producir usando las HCP obtenidas mediante procesos simulados de producción y purificación, es decir, se usa la misma línea celular usada para producir el anticuerpo de interés, pero la línea celular no se transfecta con ADN del anticuerpo. En un caso a modo de ejemplo, el segundo anticuerpo se produce usando HCP similares a las expresadas en el sistema de expresión celular de elección, es decir, el sistema de expresión celular usado para producir el anticuerpo diana.

Generalmente, un ELISA de HCP comprende intercalar una muestra líquida que comprende las HCP entre dos capas de anticuerpos, es decir, un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo. La muestra se incuba, tiempo durante el que las HCP de la muestra son capturadas por el primer anticuerpo, por ejemplo, pero no limitado a, anti-CHO de cabra, purificado por afinidad (Cygnus). Se añade un segundo anticuerpo marcado, o mezcla de anticuerpos, específico frente a las HCP producido a partir de las células usadas para generar el anticuerpo, por ejemplo, anti-HCP de CHO biotinado, y se une a las HCP de la muestra. En ciertos casos, el primer y segundo anticuerpos son anticuerpos policlonales. En ciertos aspectos, el primer y segundo anticuerpos son mezclas de anticuerpos policlonales producidos frente a HCP, por ejemplo, pero no limitados a, anti Mezcla de proteínas de célula hospedadora de cabra biotinado 599/626/748. La cantidad de HCP contenida en la muestra se determina usando el ensayo apropiado basándose en la marca del segundo anticuerpo.

Se puede usar ELISA de HCP para determinar el nivel de las HCP en una composición de anticuerpo, tal como un eluato o flujo a través obtenido usando el proceso descrito anteriormente. La presente divulgación también proporciona una composición que comprende un anticuerpo, en la que la composición no tiene ningún nivel detectable de HCP según se determina mediante un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas ("ELISA") de HCP.

5.2 Ensayo del material cromatográfico de afinidad

En ciertos casos, la presente divulgación también proporciona métodos para determinar los niveles residuales de material cromatográfico de afinidad en la composición de anticuerpo aislada/purificada. En ciertos contextos, tales materiales lixivian en la composición de anticuerpo durante el proceso de purificación. En ciertos casos, se emplea un ensayo para identificar la concentración de Proteína A en la composición de anticuerpo aislada/purificada. Como se usa en el presente documento, la expresión "ELISA de Proteína A" se refiere a un ELISA donde el segundo anticuerpo usado en el ensayo es específico frente a la Proteína A empleada para purificar el anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-13. El segundo anticuerpo se puede producir de acuerdo con métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el segundo anticuerpo se puede producir usando Proteína A de origen natural o recombinante en el contexto de métodos convencionales para generación y producción de anticuerpos.

Generalmente, un ELISA de Proteína A comprende intercalar una muestra líquida que comprende Proteína A (o que contiene posiblemente Proteína A) entre dos capas de anticuerpos anti-Proteína A, es decir, un primer anticuerpo anti-Proteína A y un segundo anticuerpo anti-Proteína A. La muestra se expone a una primera capa de anticuerpo anti-Proteína A, por ejemplo, pero no limitado a, anticuerpos policlonales o mezclas de anticuerpos policlonales, y se incuba durante un tiempo suficiente para que la Proteína A de la muestra sea capturada por el primer anticuerpo. A continuación se añade un segundo anticuerpo marcado, por ejemplo, pero no limitado a, anticuerpos policlonales o mezclas de anticuerpos policlonales, específico frente a la Proteína A, y se une a la Proteína A capturada en la muestra. Algunos ejemplos adicionales no limitantes de anticuerpos anti-Proteína A útiles en el contexto de la presente divulgación incluyen anticuerpos anti-Proteína A de pollo y anti-Proteína A biotinado. La cantidad de Proteína A contenida en la muestra se determina usando el ensayo apropiado basándose en la marca del segundo anticuerpo. Se pueden emplear ensayos similares para identificar la concentración de materiales cromatográficos de afinidad alternativos.

Se puede usar ELISA de Proteína A para determinar el nivel de Proteína A en una composición de anticuerpo, tal como un eluato o flujo a través obtenido usando el proceso descrito anteriormente. La presente divulgación también proporciona una composición que comprende un anticuerpo, en la que la composición no tiene nivel detectable de Proteína A según se determina mediante un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas ("ELISA") de Proteína A.

6. Modificaciones adicionales

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden modificar. En algunos casos, los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos se modifican químicamente para proporcionar un efecto deseado. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la pegilación de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la divulgación mediante cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica, como se describe, por ejemplo, en las siguientes referencias: Focus on Growth Factors 3:4-10 (1992); documento de Patente EP 0 154316; y documento de Patente EP 0 401 384. En un aspecto, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Un polímero soluble en agua adecuado para pegilación de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la divulgación es polietilenglicol (PEG). Como se usa en el presente documento, "polietilenglicol" pretende incluir cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono (CI-CIO) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol.

Los métodos para preparar anticuerpos y fragmentos de anticuerpo pegilados de la divulgación comprenderán generalmente las etapas de (a) hacer reaccionar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo con polietilenglicol, tal como un derivado de éster o aldehído reactivo de PEG, en condiciones adecuadas mediante las que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se llega a unir a uno o más grupos de PEG, y (b) obtener los productos de reacción. Será evidente para el experto habitual en la materia seleccionar las condiciones de reacción óptimas o las reacciones de acilación basándose en parámetros conocidos y el resultado deseado.

Generalmente, se pueden usar anticuerpos y fragmentos de anticuerpo pegilados específicos para IL-13 para tratar trastornos relacionados con IL-13 de la divulgación por administración de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo anti-IL-13 descritos en el presente documento. En general, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo pegilados tienen una mayor vida media, en comparación con los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo no pegilados. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo pegilados se pueden emplear solos, conjuntamente, o en combinación con otras composiciones farmacéuticas.

Un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación se puede derivatizar o unir a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por lo tanto, se pretende que los anticuerpos y partes de anticuerpo de la divulgación incluyan formas derivatizadas o modificadas de otro modo de los anticuerpos anti-hIL-13 humanos descritos en el presente documento, incluyendo moléculas de inmunoadhesión. Por ejemplo, el anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación se puede unir funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más de otras entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo diespecífico o un dianticuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o parte del anticuerpo con otra molécula (tal como una región núcleo de estreptoavidina o una etiqueta de polihistidina).

Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce por reticulación de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos diespecíficos). Algunos reticuladores adecuados incluyen los que son heterodifuncionales, que tienen dos grupos que reaccionan de forma distinta separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homodifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Tales conectores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Algunos agentes detectables útiles con los que se puede derivatizar un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación incluyen compuestos fluorescentes. Algunos agentes detectables fluorescentes a modo de ejemplo incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, y similares. Una anticuerpo también se puede derivatizar con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similar. Cuando el anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, se detecta por adición de reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también se puede derivatizar con biotina, y detectar mediante medición indirecta de la unión de avidina o estreptoavidina.

7. Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la divulgación se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto. Por lo general, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente

documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como las combinaciones de los mismos. En numerosos casos, es deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio, en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes de humectación o emulsión, conservantes o tampones, que mejoran la vida media o la eficacia del anticuerpo o parte de anticuerpo.

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la divulgación se pueden incorporar a una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. El anticuerpo o partes de anticuerpo se puede preparar en forma de una solución inyectable que contiene, por ejemplo, 0,1-250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta por una forma farmacéutica líquida o liofilizada en un vial, ampolla o jeringa llenada previamente, esmerilado o ámbar. El tampón puede ser L-histidina aproximadamente 1-50 mM (óptimamente 5-10 mM), a un pH de 5,0 a 7,0 (óptimamente pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Se puede usar cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma farmacéutica líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma farmacéutica liofilizada, principalmente sacarosa al 0-10 % (óptimamente al 0,5-1,0 %). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes de carga para una forma farmacéutica liofilizada, principalmente manitol al 1-10 % (óptimamente al 24 %). Se pueden usar estabilizantes en formas farmacéuticas tanto líquidas como liofilizadas, principalmente L-metionina 1-50 mM (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes de carga adecuados incluyen en glicina, arginina, y se pueden incluir como polisorbato-80 al 0-00,5 % (óptimamente al 0,005-0,01 %). Algunos tensioactivos adicionales incluyen, pero no se limitan a, los tensioactivos polisorbato 20 y BRIJ.

En un aspecto, la composición farmacéutica incluye el anticuerpo a una dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg-10 mg/kg. En otro aspecto, las dosificaciones del anticuerpo incluyen aproximadamente 1 mg/kg administradas en semanas alternas, o aproximadamente 0,3 mg/kg administradas semanalmente. El profesional sanitario experimentado puede determinar la dosificación y régimen apropiados para administración a un sujeto.

Las composiciones de la presente divulgación pueden estar en una diversidad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma depende, por ejemplo, del modo pretendido de administración y la aplicación terapéutica. Las composiciones habituales están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las que se usan para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. Un modo de administración es parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En un aspecto, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otro aspecto, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Por lo general, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular en forma de una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el principio activo (es decir, anticuerpo o parte de anticuerpo) en la cantidad requerida a un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el principio activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos liofilizados estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y secado por pulverización que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de los mismos. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Se puede provocar la absorción prolongada de composiciones inyectables por inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la presente divulgación se pueden administrar mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica, una ruta/modo de administración es inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como entenderá el experto en la materia, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertos casos, el principio activo se puede preparar con un vehículo que protegerá al principio frente a la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Numerosos métodos para la preparación de tales formulaciones se encuentran patentados o se conocen generalmente por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug

Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En ciertos aspectos, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también se puede encerrar en una cápsula de gelatina de carcasa dura o blanda, comprimir en comprimidos, o incorporar directamente a la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, los compuestos se pueden incorporar a excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas para chupar, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto de la divulgación mediante administración distinta a la parenteral, puede ser necesario revestir el compuesto, o administrar conjuntamente el compuesto, con un material para prevenir su inactivación.

También se pueden incorporar principios activos suplementarios a las composiciones. En ciertos aspectos, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación se formula conjuntamente y/o se administra conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar trastornos en los que es perjudicial la actividad de IL-13. Por ejemplo, un anticuerpo o parte de anticuerpo anti-IL-13 de la divulgación se puede formular conjuntamente y/o administrar conjuntamente con uno o más anticuerpos adicionales que se unan a otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unan a otras citoquinas o que se unan a moléculas de la superficie celular). Además, uno o más anticuerpos de la divulgación se pueden usar en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones inferiores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de ese modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas a las diversas monoterapias. El personal sanitario experto entenderá que cuando se usan los anticuerpos de la divulgación como parte de una terapia de combinación, puede ser deseable una menor dosificación del anticuerpo que cuando el anticuerpo se administra solo a un sujeto (por ejemplo, se puede conseguir un efecto terapéutico sinérgico mediante el uso de una terapia de combinación que, a su vez, permite el uso de una dosis menor del anticuerpo para conseguir el efecto terapéutico deseado).

Se ha de entender que los anticuerpos de la divulgación o la parte de unión a antígeno de los mismos se pueden usar solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, seleccionándose dicho agente terapéutico por el experto en la materia para su fin pretendido. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica como útil para tratar la enfermedad o afección que se está tratando mediante el anticuerpo de la presente divulgación. El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que tiene efecto en la viscosidad de la composición.

Además, se ha de entender que las combinaciones que se incluyen en la presente divulgación son las combinaciones útiles para su fin pretendido. Los agentes que se exponen posteriormente son ilustrativos y no se pretende que sean limitantes. Las combinaciones que son parte de la presente divulgación pueden ser los anticuerpos de la presente divulgación y al menos un agente adicional seleccionado entre la lista posterior. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede llevar a cabo su función pretendida.

Algunas combinaciones son fármacos antiinflamatorios no esteroideos también denominados AINE que incluyen fármacos tales como ibuprofeno. Otras combinaciones son corticosteroides que incluyen prednisolona; los efectos secundarios bien conocidos del uso de esteroides se pueden reducir o incluso eliminar reduciendo la dosis de esteroide requerida cuando se tratan pacientes en combinación con los anticuerpos de la presente divulgación. Algunos ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para artritis reumatoide con los que se puede combinar un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la divulgación incluyen los siguientes: fármacos antiinflamatorios supresores de citoquinas (CSAID); anticuerpos frente a o antagonistas de otras citoquinas o factores de crecimiento humanos, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la divulgación, o partes de unión a antígeno de los mismos, se pueden combinar con anticuerpos dirigidos a moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, o sus ligandos incluyendo CD 154 (gp39 o CD40L).

Algunas combinaciones de agentes terapéuticos pueden interferir en diferentes puntos en la cascada autoinmune y posteriormente inflamatoria; algunos ejemplos incluyen antagonistas de TNF tales como los anticuerpos frente a TNF quiméricos, humanizados o humanos, D2E7, (documento de solicitud de Estados Unidos con n.º de serie 08/599,226 presentado el 9 de febrero de 1996, cA2 (Remicade™), CDP 571, fragmentos de anticuerpo anti-TNF (por ejemplo, CDP870), y receptores solubles de TNF p55 o p75, derivados de los mismos, (p75TNFR1gG (Enbrel™) o p55TNFR1gG (Lenercept), receptor soluble de IL-13 (sIL-13), y además inhibidores de la enzima convertidora de TNFα (TACE); de forma similar, los inhibidores de IL-1 (por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de interleuquina 1, tales como Vx740, o IL-1RA, etc.) pueden ser ineficaces por la misma razón. Otras combinaciones incluyen interleuquina 11, anti-P7 y ligando glicoproteico de p-selectina (PSGL). Otras combinaciones más implican otros responsables de la respuesta inmune que pueden actuar de forma paralela a, dependiente de o en concierto con la función de IL-13. Otras combinaciones más incluyen inhibidores anti-CD4 no agotadores. Otras combinaciones más incluyen antagonistas de la ruta estimuladora conjunta de CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) incluyendo anticuerpos, receptores solubles o ligandos antagonistas.

Los anticuerpos de la divulgación, o partes de unión a antígeno de los mismos, también se pueden combinar con agentes, tales como metotrexato, azatioprina sulfasalazina, mesalazina, olsalazina cloroquina/hidroxicloroquina, pencilamina, aurotiomalato (intramuscular y oral), azatioprina, cochicina, corticosteroides (oral, inhalados e inyección local), antagonistas del adrenorreceptor β -2 (salbutamol, terbutalina, salmeteral), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromilo, ketotifeno, ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetilo, leflunomida, AINE, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización mediante citoquinas proinflamatorias tales como TNF α o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP quinasa), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β (por ejemplo Vx740), anti-P7, ligando glicoproteico de p-selectina (PSGL), inhibidores de la enzima convertidora de TNF α (TACE), inhibidores de la señalización de linfocitos T tales como inhibidores de quinasas, inhibidores de la metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquinas y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores solubles de TNF p55 o p75 y los derivados p75TNFRlgG (Enbrel.TM.) y p55TNFRlgG (Lenercept), sIL-1 RI, sIL-1RII, sIL-6R, receptor soluble de IL-13 (sIL-13)) y citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β). Algunas combinaciones incluyen metotrexato o leflunomida y, en casos de artritis reumatoide moderada a grave, ciclosporina.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o parte de anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o parte de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte de anticuerpo esta compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Por lo general, dado que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo individual, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. En ciertos casos, es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en formas unitarias de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se tratan; comprendiendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la divulgación están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del principio activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se consigue, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la formación de tal principio activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un intervalo no limitante a modo de ejemplo para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación es 0,01-20 mg/kg, o 1-10 mg/kg, o 0,3-1 mg/kg. Se ha de observar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que se alivia. Además, se ha de entender que, para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deberían ajustar a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son únicamente a modo de ejemplo y no se pretende que limiten el ámbito o la práctica de la composición reivindicada.

8. Usos de los anticuerpos de la divulgación

8.1 Generalidades de los usos de anticuerpos anti-IL-13

Dada su capacidad para unirse a IL-13, los anticuerpos anti-IL-13, o partes de unión a antígeno de los mismos, de la divulgación se pueden usar para detectar IL-13, en un aspecto, hIL-13 (por ejemplo, en una matriz de muestra, en un aspecto, una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando inmunoensayo convencional, tal como ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. La divulgación proporciona un método para detectar IL-13 en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la divulgación y detectar el anticuerpo unido a IL-13 o anticuerpo sin unir, para detectar de ese modo IL-13 en la muestra. El anticuerpo está marcado directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o sin unir. Algunas sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes,

materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Algunos ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; algunos ejemplos de complejos de grupos prostéticos incluyen estreptoavidina/biotina y avidina/biotina; algunos ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y algunos ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , o ^3H . La detección de IL-13 en una muestra puede ser útil en un contexto diagnóstico, por ejemplo en el diagnóstico de una afección asociada con el aumento de IL-13, y/o puede ser útil en la identificación de un sujeto que puede beneficiarse del tratamiento con un anticuerpo anti-IL-13.

Como alternativa a los ensayos de detección que implican anticuerpo anti-IL-13 marcado, se puede detectar IL-13 en una muestra mediante un inmunoensayo competitivo utilizando, por ejemplo, estándares de rhIL-13 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-13 sin marcar, tal como un anticuerpo anti-hIL-13. En este ensayo, la muestra, los estándares de rhIL-13 marcados, y el anticuerpo anti-hIL-13 se combinan y se determina la cantidad de estándar de rhIL-13 marcado unido al anticuerpo sin marcar. La cantidad de hIL-13 en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de estándar de rhIL-13 marcado unido al anticuerpo anti-hIL-13.

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la divulgación son capaces de neutralizar la actividad de IL-13 *in vitro* e *in vivo*, en un aspecto, una actividad de hIL-13. Por lo tanto, los anticuerpos y partes de anticuerpo de la divulgación se pueden usar para inhibir la actividad de IL-13, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene IL-13, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen IL-13 con el que un anticuerpo de la divulgación tiene reactividad cruzada (por ejemplo, primates tales como babuino, cinomolgo y macaco Rhesus). En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo humano aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, que neutraliza la actividad de IL-13 humana, y al menos una IL-13 de primate adicional seleccionada entre el grupo que consiste en IL-13 de babuino, IL-13 de tití, IL-13 de chimpancé, IL-13 de cinomolgo, e IL-13 de macaco Rhesus, pero que no neutraliza la actividad de la IL-13 de ratón. En un aspecto, la IL-13 es IL-13 humana. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene, o se sospecha que contiene, hIL-13, se puede añadir un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación al medio de cultivo para inhibir la actividad de hIL-13 en el cultivo.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para inhibir la actividad de IL-13 en un sujeto que padece un trastorno en el que es perjudicial la actividad de IL-13. Como se usa en el presente documento, la expresión "un trastorno en el que es perjudicial la actividad de IL-13" pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los que la presencia de IL-13 en un sujeto que padece el trastorno se ha mostrado o se sospecha que es responsable de la fisiopatología del trastorno o un factor que contribuye a empeorar el trastorno. Por lo tanto, un trastorno en el que es perjudicial la actividad de IL-13 es un trastorno en el que se espera que la inhibición de la actividad de IL-13 alivie los síntomas y/o el progreso de la enfermedad. Tales trastornos pueden evidenciarse, por ejemplo, por un aumento en la concentración de IL-13 en un fluido biológico de un sujeto que padece el trastorno (por ejemplo, un aumento en la concentración de IL-13 en suero, plasma, fluido sinovial, etc., del sujeto), que se puede detectar, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-IL-13 como se ha descrito anteriormente. En un aspecto, los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos se pueden usar en terapia para tratar las enfermedades o trastornos que se describen en el presente documento. En otro aspecto, los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos, se pueden usar para la fabricación de una medicina para tratar las enfermedades o trastornos que se describen en el presente documento. Existen numerosos ejemplos de trastornos en los que es perjudicial la actividad de IL-13. Por ejemplo, IL-13 desempeña un papel crítico en la patología asociada a una diversidad de enfermedades que implican elementos inmunes e inflamatorios, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades respiratorias, tales como asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Algunos trastornos relacionados con IL-13 adicionales incluyen, pero no se limitan a: trastornos a tópicos (por ejemplo, dermatitis atópica y rinitis alérgica); afecciones inflamatorias y/o autoinmunes de la piel, órganos gastrointestinales (por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), tales como colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn), y el hígado (por ejemplo, cirrosis, fibrosis); esclerodermia; tumores o cánceres, por ejemplo, linfoma de Hodgkin.

Por lo tanto, los anticuerpos anti-IL-13 o partes de unión a antígeno de los mismos, o vectores que expresan los mismos *in vivo* están indicados para el tratamiento de enfermedades, tales como asma u otras afecciones inflamatorias y/o autoinmunes en las que existe una expresión aberrante de IL-13, que conduce a un exceso de IL-13 o en casos de complicaciones debido a IL-13 administrada de forma exógena.

8.2 Uso de anticuerpo anti-IL-13 en trastornos respiratorios

En ciertos casos de la presente divulgación, un anticuerpo anti-IL-13, o una parte de unión a antígeno del mismo, se emplean en el tratamiento de uno o más trastornos asociados a IL-13, que incluyen, pero no se limitan a, trastornos respiratorios (por ejemplo, asma (por ejemplo, asma alérgica y no alérgica (por ejemplo, asma debida a infección con, por ejemplo, virus respiratorio sincitial (RSV), por ejemplo, en niños menores))), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y otras afecciones que implican inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de mucosidad, por ejemplo, fibrosis quística y fibrosis pulmonar.

En ciertos casos, la presente solicitud proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, reducción, mejora) o

prevención de uno o más síntomas asociados a un trastorno respiratorio, por ejemplo, asma (por ejemplo, asma alérgico y no alérgico); alergias; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); una afección que implica la inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de mucosidad, por ejemplo, fibrosis quística y fibrosis pulmonar. Por ejemplo, los síntomas de asma incluyen, pero no se limitan a, sibilancias, dificultad para respirar, broncoconstricción, hiperreactividad de las vías respiratorias, disminución de la capacidad pulmonar, fibrosis, inflamación de las vías respiratorias, y producción de mucosidad. El método comprende administrar al sujeto un anticuerpo frente a IL-13, o un fragmento del mismo, en una cantidad suficiente para tratar (por ejemplo, reducir, mejorar) o prevenir uno o más síntomas. El anticuerpo frente a IL-13 se puede administrar terapéutica o profilácticamente, o ambos. El antagonista de IL-13, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-13, o fragmento del mismo, se puede administrar al sujeto solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas que se describen en el presente documento. En ciertos casos, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano que padece un trastorno asociado a IL-13 como se describe en el presente documento.

Como se ha indicado anteriormente, se ha descubierto que IL-13 desempeña un papel principal en la producción de respuestas patológicas asociadas al asma. Sin embargo, otros mediadores de rutas inmunológicas diferenciales también se han visto implicados en la patogénesis del asma, y el bloqueo de estos mediadores, además de IL-13, puede ofrecer un beneficio terapéutico adicional. De ese modo, las proteínas de unión de la divulgación se pueden incorporar a un anticuerpo diespecífico, anticuerpo diespecífico que es capaz de unirse a pares de dianas que incluyen, pero no se limitan a, IL-13 y una citoquina proinflamatoria, tal como factor de necrosis tumoral α (TNF- α). TNF- α puede amplificar la respuesta inflamatoria en el asma y puede estar asociado a la gravedad de la enfermedad (McDonnell *et al.*, *Progress in Respiratory Research* (2001), 31 (New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250). Esto sugiere que bloquear tanto IL-13 como TNF- α puede tener efectos beneficiosos, en particular en enfermedad grave de las vías respiratorias. En un caso no limitante, el anticuerpo diespecífico de la divulgación se une a las dianas de IL-13 y TNF- α y se usa para tratar asma.

En otro caso, las proteínas de unión de la divulgación se pueden usar para generar moléculas de anticuerpo diespecífico que se unen a IL-13 e IL-1beta, IL-13 e IL-9; IL-13 e IL-4; IL-13 e IL-5; IL-13 y DL-25; IL-13 y ARC; EL-13 y MDC; IL-13 y M1F; IL-13 y TGF- β ; EL-13 y agonista de LHR; DL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; EL-13 y SPRR2b; y DL-13 y ADAM8. La presente divulgación también proporciona anticuerpos diespecíficos capaces de unirse a IL-13 y una o más dianas implicadas en el asma seleccionadas entre el grupo que consiste en CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFNA1, IFNB1; IFNG, histamina y receptores de histamina, EL1A, DL1B, BL2, IL3, EL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, ELI 1, IL12A, IL12B, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, EL19, IL-20, IL-21, IL-22, EL-23, EL-24, EL-25, IL-26, IL-27, EL-28, IL-30, EL-31, EL-32, IL-33, KtTLG, PDGFB, IL2RA, EL4R, IL5RA, IL8RA, DL8RB, IL12RB1, IL12RB2, EL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, y quitinasa.

EJEMPLOS

1. Producción de anticuerpo anti-IL-13

Un lote de producción de sustancia farmacológica es una solución de anticuerpo monoclonal ABT-308 obtenida a partir del tren de semilla, producción, recuperación primaria y captura, y purificación fina de la sustancia farmacológica procedente de un ciclo individual del reactor de producción.

1.1 Preparación del medio

Se preparan soluciones de acuerdo con los registros de soluciones GMP con agua purificada que cumple con los estándares USP/EP/JP. La solución de medio formulada se filtra a través de un filtro de 0,1 μ m en un recipiente, bolsa o biorreactor preesterilizado de tamaño apropiado. La integridad del filtro de 0,1 μ m se somete a ensayo después de su uso. Las composiciones de los medios de crecimiento y producción se dan en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de medios de cultivo celular

| Materia prima | Medio de crecimiento SR-512 | Medio de crecimiento SR-520 | Medio de producción SR-521 |
|--|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| PFCHO (A)-S 1 | - | + | + |
| PFCHO Parte A (modificado) con glutamina, sin NaHCO ₃ | + | - | - |
| PFCHO Parte B (solución de trabajo de citrato férrico) | + | + | + |
| Insulina humana recombinante | + | + | - |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Dextrosa anhidra | - | + | + |
| L-glutamina | + | + | + |
| Monohidrato de L-asparagina | - | + | - |
| Bicarbonato de sodio | + | + | + |
| HEPES, ácido libre | - | + | + |
| NaCl | - | + | + |
| Pluronic F-68 (Poloxámero 188, NF) | - | + | + |
| NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O | - | + | + |
| Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O | - | + | + |
| Bacto TC Levadurolato | + | + | + |
| Peptona Fitona | - | + | + |
| Metotrexato | + | + | + |
| NaOH 2 N | - | + | + |
| HCl 2 N | - | + | + |

1.2 Expansión del inóculo

5 Las operaciones en matraz para rotor y bolsa Biowave sirven para expandir las células CHO de un vial congelado individual de MCB a la biomasa deseada para la inoculación de un biorreactor de semilla de 110 l. Se descongela un vial congelado de células CHO de banco celular maestro y se coloca en medio de cultivo (SR-512) y se centrifuga. Las células se resuspenden en medio de cultivo y se expanden a 37 °C y CO₂ al 5 % en matraces para rotor desechables o bolsas Biowave de volumen creciente. Se usan bolsas onduladas de 20 l por duplicado para maximizar la expansión de masa celular final antes de la inoculación en el biorreactor de semilla. Cuando la densidad celular alcanza $\geq 2,0 \times 10^6$ células viables/ml a partir de ambas bolsas onduladas de 20 l en aproximadamente 15-17 días, el cultivo se transfiere a un biorreactor de semilla de 110 l cargado con medio de crecimiento SR-520 para expansión adicional. Después de la inoculación, la temperatura objetivo es 37 °C, y el pH se ajusta a un objetivo de 7,1 y se controla por adición de NaOH e introducción de CO₂. El oxígeno disuelto (DO) en el biorreactor se controla en un valor objetivo de un 40 % por introducción de aire y oxígeno. Una vez la densidad celular alcanza $\geq 2,6 \times 10^6$ células viables/ml después de aproximadamente 2-4 días, el cultivo se transfiere a un biorreactor de producción de 3000 l.

1.3 Biorreactor de llenado parcial

20 Se usa un llenado parcial de un biorreactor de producción de 3000 l para expandir adicionalmente el cultivo celular. Inicialmente, el reactor se carga con medio de cultivo (SR-520) y se inocula con el lote del reactor de semilla de 110 l.

25 Durante esta etapa de llenado parcial, la temperatura, oxígeno disuelto y pH se controlan a 37 °C, 40 %, y 7,1, respectivamente. El pH del cultivo se controla por introducción de CO₂ y adición de NaOH. Por lo general, las células crecen durante 2-4 días después de alcanzar la densidad requerida de $\geq 1,6 \times 10^6$ células viables/ml.

1.4 Biorreactor de producción

30 Se añade medio de producción SR-521 (1950 l) al cultivo celular en el biorreactor de 3000 l para iniciar la etapa de producción. Se añade antiespumante C para disminuir la formación de espuma. El pH del cultivo se controla a un valor objetivo de 6,9 con conexión o desconexión de introducción de CO₂ y adición de NaOH. La temperatura y el oxígeno disuelto se controlan a valores objetivo de 35 °C y un 40 %, respectivamente. DO en el biorreactor se controla inicialmente al valor deseado por introducción de aire y se suplementa con oxígeno puro si fuera necesario. 35 La temperatura se disminuye a un valor objetivo de 33 °C cuando la densidad de células viables alcanza $\geq 3,0 \times 10^6$ células viables/ml, y pH y DO se mantienen en valores objetivo de 6,9 y un 40 %, respectivamente. Se añade glucosa (SR-334) según necesidades. Los cultivos se recogen cuando la viabilidad celular disminuye a ≤ 50 %.

1.5 Rendimiento del proceso

40 El rendimiento del proceso y los resultados del ensayo en el proceso son los que se dan en la Tabla 3 y la Tabla 4, respectivamente.

Tabla 3. Rendimiento del proceso de cultivo celular para la fabricación de ABT-308

| Tren de semilla | Límite de acción | N.º de lote | | |
|---|------------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 55173BI | 55176BI | 57199BI |
| Viabilidad en la transferencia al biorreactor de semilla (%) | ≥ 80 | 96 | 98 | 96 |
| Densidad de células viables en la transferencia al biorreactor de semilla (x 10 ⁶ /ml) | ≥ 2,0 | 2,2 | 2,8 | 3,0 |
| Biorreactor de semilla y producción | | 55448BI | 57128BI | 58067BI |
| Densidad de células viables en la transferencia al llenado parcial (x 10 ⁶ /ml) | ≥ 2,6 | 3,0 | 3,1 | 3,8 |
| Densidad de células viables al final del llenado parcial (x 10 ⁶ /ml) | ≥ 1,6 | 1,7 | 2,1 | 2,1 |
| Densidad de células viables en el desplazamiento de temperatura (x 10 ⁶ /ml) | ≥ 3,0 | 3,5 | 3,2 | 3,2 |
| Viabilidad en la recogida (%) | ≤ 50 | 45 | 25 | 40 |
| Título de ABT-308 en la recogida (g/l) | Valor informado | 1,10 | 1,08 | 1,08 |

Tabla 4. Resultados del ensayo en el proceso del proceso de cultivo celular

| Tren de semilla | Límite de acción | N.º de lote | | |
|-----------------------------------|---|----------------|----------------|----------------|
| | | 55173BI | 55176BI | 57199BI |
| Comprobación de contaminación | Sin crecimiento | Aprobado | Aprobado | Aprobado |
| Biorreactor de semilla | | 55448BI | 57128BI | 58067BI |
| Comprobación de contaminación | Sin crecimiento | Aprobado | Aprobado | Aprobado |
| Biorreactor de producción | | 55448BI | 57129BI | 58067BI |
| Endotoxina (EU/ml) | ≤ 5 | ≤ 1 | ≤ 1 | ≤ 1 |
| TEM (partículas de tipo viral/ml) | ≤ 10 ⁸ | Aprobado | Aprobado | Aprobado |
| Micoplasma | Negativo ^a | Aprobado | Aprobado | Aprobado |
| Virus casual | Sin evidencia de contaminación viral ^a | Aprobado | Aprobado | Aprobado |
| Q-PCR para MVM | Negativo ^a | Aprobado | Aprobado | Aprobado |
| Comprobación de contaminación | Sin crecimiento ^a | Aprobado | Aprobado | Aprobado |
| a. Especificaciones | | | | |

2. Aislamiento y purificación de anticuerpo anti-IL-13

- 5 Las operaciones de recuperación primaria y captura incluyen clarificado del material recogido por filtración, captura del anticuerpo mediante cromatografía de afinidad a Proteína A, e inactivación viral a pH bajo seguido de filtración en lecho profundo. Las operaciones de purificación fina incluyen cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, filtración viral, ultrafiltración/diafiltración, y filtración final, embotellado y congelación.

10 2.1 Preparación de soluciones

Las soluciones se preparan de acuerdo con el registro de soluciones GMP con agua purificada USP (USP-PW) o agua para inyección (WFI). La mayoría de las soluciones se filtran a través de un filtro de 0,2 µm en bolsas irradiadas, o recipientes esterilizados en autoclave o al vapor en el lugar.

2.2 Recuperación primaria y clarificado

El fin de la recuperación primaria por filtración es retirar células y residuos celulares del material recogido del biorreactor de producción. El material recogido sin procesar se hace pasar a través de un tren de filtros que consiste en filtros de lecho profundo, filtros de lecho profundo Delipid y filtros de membrana. El sobrenadante clarificado se recoge en el tanque de recogida y se mantiene a 2-8 °C. Los controles en el proceso para el material recogido clarificado incluyen la concentración de ABT-308 mediante cromatografía de Poros A, carga biológica y ensayo de endotoxinas.

2.3 Cromatografía de afinidad a Proteína A

El objetivo de la cromatografía de afinidad a Proteína A es capturar ABT-308 del material recogido clarificado y reducir las impurezas relacionadas con el proceso. Por lo general se llevan a cabo tres ciclos de cromatografía para procesar el material recogido completo. Las mezclas de producto de los tres ciclos se combinan para procesamiento adicional.

Se empaqueta una columna de 45 cm de diámetro x 22 cm de longitud (35 l) con resina de Proteína A MabSelect® (GE Healthcare) o ProSep Ultra Plus™ (Millipore) y se cualifica para su uso. El tampón de almacenamiento se retira de la columna con agua purificada USP (USP-PW) seguido de ácido acético 0,2 M y finalmente por clarificado con USP PW. La columna se equilibra con Tris 25 mM, NaCl 100 mM, a un pH de 7,2, y a continuación se carga con el material recogido clarificado hasta un máximo de 32 g de proteína/l de resina para la resina de Proteína A MabSelect® (GE Healthcare) o 45 g de proteína/l de resina para la resina ProSep Ultra Plus™ (Millipore). La columna se lava con Tris 25 mM, NaCl 100 mM, a un pH de 7,2, y a continuación con citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, a un pH de 6,0, y finalmente se lava de nuevo con Tris 25 mM, NaCl 100 mM, a un pH de 7,2. El anticuerpo se eluye de la columna con ácido acético 0,1 M, a un pH de 3,5. Después de cada ciclo, el pH de la mezcla de eluato se ajusta a un objetivo de 4,1, si se requiere. Los controles en el proceso incluyen la determinación de la concentración de proteínas mediante A₂₈₀, SE-HPLC, carga biológica y ensayo de endotoxinas.

Después del primer ciclo, la columna se regenera con ácido acético 0,2 M y se clarifica con USP-PW. Después del segundo ciclo, la columna se regenera con ácido acético 0,2 M, se clarifica con USP-PW, y a continuación se desinfecta con ácido acético 0,1 M, etanol al 20 % seguido de lavado y almacenamiento a corto plazo en acetato de sodio 50 mM, etanol al 20 %, pH 5. Después del tercer ciclo, la columna se regenera con ácido acético 0,2 M y se clarifica con USP-PW. A continuación se limpia con ácido acético 0,4 M, NaCl 0,5 M, Tween 80 al 0,1 %, seguido de USP-PW, seguido de NaOH 50 mM, NaCl 1,0 M, y a continuación USP-PW. Finalmente se desinfecta con ácido acético 0,1 M, etanol al 20 % seguido de lavado y almacenamiento en ácido acético 50 mM, etanol al 20 %, pH 5,0.

2.4 Incubación a pH bajo y filtración

La incubación a pH bajo es una etapa de reducción viral dedicada que proporciona una garantía adicional de seguridad viral por inactivación de virus casuales envueltos que podrían estar presentes en el eluato de Proteína A. El fin de la filtración después de la incubación a pH bajo es retirar cualquier precipitado que se pueda formar durante el tratamiento a pH bajo.

El pH de los eluatos de cromatografía de Proteína A combinados se ajusta a un valor objetivo de 3,5 con ácido fosfórico 0,5 M y se mantiene a 18-25 °C durante 60-70 minutos. La mezcla se ajusta a continuación a un pH de 5 con Tris 1 M, pH 10, se clarifica mediante una combinación de filtros de lecho profundo y filtros de membrana, y a continuación se enfría a 10-14 °C. Los controles en el proceso para la etapa de tratamiento de pH bajo y filtración incluyen determinación de la concentración de proteínas mediante A₂₈₀, SE-HPLC, carga biológica y ensayo de endotoxinas.

2.5 Rendimiento del proceso de recuperación primaria y captura

El rendimiento del proceso para las operaciones de recuperación primaria y captura se da en la Tabla 5, y los resultados de los controles en el proceso se dan en la Tabla 6.

Tabla 5. Rendimiento del proceso de recuperación primaria y captura

| Operación unitaria | Rendimiento (%) | | |
|--|-----------------|---------|---------|
| | 56136BI | 57058BI | 58207BI |
| Lote | | | |
| Clarificado del material recogido | 80 | 81 | 87 |
| Cromatografía de Proteína A | 103 | 109 | 99 |
| Incubación a pH bajo y preparación de carga de Q | 79 ^b | 91 | 97 |

| | | | |
|--|--|--|--|
| Sepharose™ ^a | | | |
| a. Rendimiento combinado debido a error en la toma de muestra después de la inactivación a pH bajo. b. El área del filtro de lecho profundo fue tres veces mayor en el lote 56136BI que en los lotes 57058BI y 59207BI. La mayor área del filtro en el lote 56136BI dio como resultado una disminución del rendimiento. | | | |

Tabla 6. Resultados del ensayo en el proceso del proceso de recuperación primaria y captura

| Operación unitaria | Ensayo en el proceso | Límite de acción | 56136BI | 57058BI | 58207BI |
|---|----------------------|------------------|-----------------|---------|---------|
| Clarificado del material recogido | Carga biológica | ≤ 15,0 CFU/ml | NA ^b | 0,0 | 0,6 |
| | Endotoxinas | ≤ 5 EU/ml | NA ^b | < 1 | < 1 |
| Cromatografía de Proteína A | SE-HPLC | ≥ 90,0 % | 97,4 | 96,6 | 96,5 |
| | Carga biológica | ≤ 15,0 CFU/ml | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Endotoxinas | ≤ 5 EU/ml | < 1 | < 1 | < 1 |
| Incubación a pH bajo | SE-HPLC | ≥ 90,0 % | 98,4 | 97,9 | 98,0 |
| | Carga biológica | ≤ 15,0 CFU/ml | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Endotoxinas | ≤ 5 EU/ml | < 1 | < 1 | < 1 |
| a. Las muestras de carga biológica y endotoxinas se tomaron al comienzo de la siguiente operación unitaria. b. No se tomó ninguna muestra. | | | | | |

2.6 Cromatografía de intercambio aniónico fuerte

5 El fin de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico fuerte es reducir las impurezas relacionadas con el proceso tales como proteínas de célula hospedadora, ADN y endotoxinas. También puede servir como etapa de clarificado viral. En ciertas realizaciones, se opera una columna de resina Q Sepharose™ FF en modo de flujo a través en el que el anticuerpo fluye a través de la columna y las impurezas permanecen unidas a la resina, en realizaciones alternativas, se emplea una membrana Mustang Q™ (Pall Corp.) en lugar de la columna de resina de Q Sepharose™ FF. Las operaciones se llevan a cabo a 10-14 °C.

10 Se empaqueta una columna de 45 cm de diámetro x 22 cm de longitud (35 l) con resina Q Sepharose™ FF (GE Healthcare) y se cualifica para su uso. La columna se equilibra con Tris 25 mM, NaCl 50 mM, a un pH de 8,0. El pH de la solución de inactivación neutralizada y filtrada se ajusta a 8,0 con Tris 1 M, a un pH de 10, se ajusta la conductividad a 5,0-6,5, y la solución se filtra a través de filtros Delipid y de membrana. La carga de Q Sepharose™ se bombea a través de la columna a una carga máxima de 80 g de proteína/l de resina. Después de la carga, la columna se lava con Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0, y se combinan el flujo a través y el lavado. Esto es la mezcla del flujo a través de Q Sepharose™ y el lavado (QFTW). Los controles en el proceso para la etapa de Q Sepharose™ incluyen concentración mediante A₂₈₀, SE-HPLC, carga biológica y ensayo de endotoxinas.

15 La columna se regenera con fosfato de sodio 25 mM, NaCl 1,0 M, a un pH de 7,0, seguido de un clarificado con WFI, y desinfección con NaOH 1,0 M seguido de un clarificado con WFI. La columna se neutraliza a continuación con fosfato de sodio 25 mM, NaCl 1,0 M, a un pH de 7,0, y se almacena en fosfato de sodio 25 mM, isopropanol al 20 %, pH 7,0.

2.7 Cromatografía de interacción hidrófoba

20 El fin de la etapa de Fenil Sepharose™ es la retirada de los agregados de ABT-308, fragmentos e impurezas relacionadas con el proceso. Las operaciones se llevan a cabo a 10-14 °C.

25 Se empaqueta una columna de 60 cm de diámetro x 15 cm de longitud (42 l) con resina Fenil Sepharose™ HP (GE Healthcare) y se cualifica para uso. La columna se equilibra con WFI y a continuación con fosfato de sodio 20 mM, sulfato de amonio 1,1 M, a un pH de 7,0.

30 El flujo a través de Q Sepharose™ y el lavado se diluyen 1:1 (v/v) con fosfato de sodio 40 mM, sulfato de amonio 2,2 M, a un pH de 7,0. Esta solución, la carga de Fenil Sepharose™, se filtra a través de un filtro de 0,2 µm y se carga en la columna con una carga máxima de 64 g de proteína/l de resina. La columna se lava con fosfato de sodio 25 mM, sulfato de amonio 1,4 M, a un pH de 7,0, y se eluye ABT-308 de la columna con fosfato de sodio 11 mM, sulfato de amonio 0,625 M, a un pH de 7,0. Los controles en el proceso para la etapa de Fenil Sepharose™ incluyen concentración mediante A₂₈₀, SE-HPLC, carga biológica y ensayo de endotoxinas.

La columna se regenera con WFI, a continuación se desinfecta con NaOH 1 M, se lava con WFI, y se almacena en fosfato de sodio 25 mM, isopropanol al 20 %, pH 7.

5 2.8 Nanofiltración

La nanofiltración es una etapa de clarificado viral dedicado que proporciona una garantía adicional de seguridad viral mediante la retirada de virus casuales ≥ 20 nm de diámetro que podrían estar presentes en el eluato de la columna de Fenil Sepharose™ HP. Las operaciones se llevan a cabo a 10-14 °C.

El eluato de la columna de Fenil Sepharose™ HP se hace pasar a través de un filtro de 0,1 μ m y un tren de filtros Ultipor DV20 humedecido previamente con histidina 15 mM, a un pH de 5,6. Después de la filtración, el tren de filtros se lava abundantemente con histidina 15 mM, a un pH de 5,6, para recuperar cualquier cantidad retenida de ABT-308. Después de su uso, se lleva a cabo un ensayo de integridad en el filtro DV20 y el filtro se desecha. Si el filtro no aprueba el ensayo de integridad, la solución se puede volver a filtrar como se ha descrito anteriormente. Los controles en el proceso para la etapa de nanofiltración incluyen concentración de proteínas mediante A₂₈₀, SE-HPLC, carga biológica y ensayo de endotoxinas.

20 2.9 Formulación de la sustancia farmacológica ABT-308 mediante ultrafiltración/diafiltración

El fin de la etapa de UF/DF es la diafiltración de la sustancia farmacológica en el tampón de formulación final, histidina 15 mM, pH 5,6, y la concentración de ABT-308. Estas operaciones se llevan a cabo a 10-14 °C.

El nanofiltrado se concentra a aproximadamente 50 g/l usando membranas de poliéter sulfona de MWCO de 30 kDa, se diafiltra con tampón de formulación y a continuación se concentra hasta aproximadamente 180 g/l. El sistema de UF se vacía de producto y se clarifica con tampón de diafiltración para recuperar cualquier cantidad de producto remanente en el sistema. El concentrado y el lavado se combinan para producir ABT-308 diafiltrado a una concentración de aproximadamente 120-160 g/l. El ABT-308 concentrado se filtra a través de filtros de membrana. Los controles en el proceso para la etapa de ultrafiltración/diafiltración incluyen concentración mediante A₂₈₀, SE-HPLC, carga biológica y ensayo de endotoxinas.

Después de cada proceso, el sistema de ultrafiltración se lava abundantemente con WFI y se limpia con solución de hipoclorito de sodio de 250 ppm, a continuación se desinfecta y se almacena en hidróxido de sodio 0,1 M.

35 2.10 Filtración final, embotellado y congelación

Las operaciones de filtración y embotellado se llevan a cabo en un área de Clase 100 a 2-8 °C en una Campana de flujo laminar de Clase 100. El ABT-308 formulado se filtra a través de un filtro de 0,2 μ m en botellas de PETG exentas de pirógenos previamente esterilizadas. Las botellas etiquetadas se ponen en un congelador vacío a -80 °C (nominal) hasta que se congelan y a continuación se transfieren a congeladores de almacenamiento mantenidos a -80 °C (nominal). Los controles en el proceso para la etapa de filtración final y embotellamiento incluyen A₂₈₀, carga biológica y ensayo de endotoxinas (resultados de ensayo de la sustancia farmacológica).

45 2.11 Rendimiento del proceso de purificación final

El rendimiento del proceso para las operaciones de recuperación primaria y captura se dan en la Tabla 7, y los resultados de los controles en el proceso se dan en la Tabla 8.

Tabla 7. Rendimiento del proceso de purificación fina

| Operación unitaria | Rendimiento (%) | | |
|---|-----------------|----------|---------|
| | 56003BF | 57001 BF | 57002BF |
| Cromatografía de intercambio aniónico | 96 | 95 | 93 |
| Cromatografía de interacción hidrófoba | 97 | 92 | 94 |
| Nanofiltración | 98 | 98 | 96 |
| Ultrafiltración/diafiltración | 91 | 94 | 89 |
| Filtración final, llenado y congelación | 93 | 97 | 100 |
| Rendimiento global, captura y purificación fina | 50 | 63 | 63 |

Tabla 8. Resultados del ensayo en el proceso de purificación fina

| Operación unitaria | Ensayo en el proceso ^a | Límite de acción | 56003BF | 57001BF | 57002BF |
|---|-----------------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Cromatografía de intercambio aniónico | SE-HPLC | ≥ 90,0 % | 99,1 | 98,5 | 98,4 |
| | Carga biológica | ≤ 15,0 CFU/ml | 0,0 | 0,1 | 0,0 |
| | Endotoxinas | ≤ 5 EU/ml | < 1 | < 1 | < 1 |
| Cromatografía de interacción hidrófoba | SE-HPLC | ≥ 90,0 % | 99,8 | 99,7 | 99,7 |
| | Carga biológica | ≤ 15,0 CFU/ml | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Endotoxinas | ≤ 5 EU/ml | < 1 | < 1 | < 1 |
| Nanofiltración | SE-HPLC | ≥ 90,0 % | 99,8 | 99,7 | 99,7 |
| | Carga biológica | ≤ 15,0 CFU/ml | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Endotoxinas | ≤ 5 EU/ml | < 1 | < 1 | < 1 |
| Ultrafiltración/diafiltración | SE-HPLC | ≥ 90,0 % | 99,7 | 99,6 | 99,6 |
| | Carga biológica | ≤ 15,0 CFU/ml | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Endotoxinas | ≤ 5 EU/ml | 6 ^b | < 1 | < 1 |
| Filtración final, llenado y congelación | Carga biológica | ≤ 1 CFU/m ^c | 0 ^d | 0 ^d | 0 ^d |
| | Endotoxinas | ≤ 0,2 EU/mg ^c | < 0,1 ^d | < 0,1 ^d | < 0,1 ^d |

a. Las muestras de carga biológica y endotoxinas se toman al comienzo de la siguiente operación unitaria.
b. El resultado de endotoxinas de 6 EU/ml no se considera significativo debido a que la sustancia farmacológica posterior cumplió las especificaciones de ≤ 0,2 EU/mg. Además, el lote 56003BF fue un proceso sometido a ingeniería y no proporcionado para uso humano.
c. Especificaciones proporcionadas de la sustancia farmacológica.
d. Resultados proporcionados de la sustancia farmacológica.

3. Determinación de la concentración de proteínas de célula hospedadora en las composiciones de anticuerpo

- 5 Este procedimiento describe la metodología de ensayo para la determinación de la concentración residual de Proteínas de célula hospedadora en muestras de anticuerpo. Se usa un ensayo por inmuoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para intercalar la Proteína de célula hospedadora (Antígenos) entre dos capas de anticuerpos específicos. Esto va seguido por el bloqueo de sitios no específicos con Caseína. A continuación, se incuban las Proteínas de célula hospedadora, tiempo durante el que las moléculas de antígeno son capturadas por el primer anticuerpo (Anticuerpo de revestimiento). A continuación, se añade un segundo anticuerpo (anti-Proteína de célula hospedadora biotinado) que se fija al antígeno (Proteínas de célula hospedadora). Se añade conjugado de HRP neutravidina que se une al anticuerpo anti-Proteína de célula hospedadora biotinado. Esto va seguido de la adición de sustrato azul K. El sustrato cromogénico se hidroliza mediante el anticuerpo conjugado a enzima unido, produciendo un color azul. La reacción se detiene con H₃PO₄ 2 M, cambiando el color a amarillo. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de antígeno unido en el pocillo.

Preparación de Bicarbonato de sodio 50 mM (Tampón de revestimiento), a un pH de 9,4. Añadir a un vaso de precipitados de 1 l: 900 ml de agua Mili-Q; 4,20 g ± 0,01 g de Bicarbonato de sodio. Agitar hasta disolver completamente. Ajustar el pH a 9,4 con NaOH 1 N. Transferir a un matraz volumétrico de 1 l y llevar al volumen con agua Mili-Q. Mezclar por inversión hasta conseguir homogeneidad. Filtrar a través de una unidad de filtración estéril de 0,22 µm. Almacenar a 4 °C nominales durante hasta 7 días desde la fecha de preparación.

Preparación de Na₂HPO₄ * 7H₂O 0,104 M, NaCl 1,37 M, KCl 0,027 M, KH₂PO₄ 0,0176 M, pH = 6,8 - 6,9 (PBS 10x). Añadir aproximadamente 400 ml de Mili-Q agua a un vaso de precipitados de vidrio. Añadir 13,94 g ± 0,01 g de Na₂HPO₄ x 7H₂O. Añadir 40,0 g ± 0,1 g de NaCl. Añadir 1,00 g ± 0,01 g de KCl. Añadir 1,20 g ± 0,01 g de KH₂PO₄. Agitar hasta obtener homogeneidad. Transferir a un matraz volumétrico de 500 ml. Añadir c.s. hasta un volumen de 500 ml con agua Mili-Q. Mezclar por inversión. Filtrar a través de una unidad de filtración estéril de 0,2 µm. Almacenar a temperatura ambiente durante hasta 7 días.

Preparación de PBS 1x + Triton X-100 al 0,1 %, pH 7,40: (Tampón de lavado de placa). En un cilindro graduado de 4 l, mezclar 400 ml de PBS 10x (etapa 5.2) con 3500 ml de agua Mili-Q. Comprobar el pH, y ajustar si fuera necesario a 7,40 ± 0,05 con HCl 1 N o NaOH 1 N. Llevar al volumen con agua Mili-Q. Tapar firmemente con Parafilm

el cilindro y mezclar por inversión hasta obtener homogeneidad. Transferir a una botella de 4 l. Retirar 4 ml del PBS 1x y desechar. Añadir 4 ml de triton X-100 a los 3996 ml de PBS 1x. Poner en la placa de agitación y agitar hasta disolver completamente. Filtrar la cantidad de tampón de lavado de placa necesaria para la preparación del tampón de dilución a través de una unidad de filtración estéril de 0,2 µm. Almacenar a temperatura ambiente durante hasta 7 días.

Preparación de Mezcla de anticuerpo de revestimiento: anti CHO 599/626/748 de cabra (n.º de lote G11201 a 1,534 mg/ml), purificado por afinidad: NOTA: las soluciones de trabajo se almacenan a -80 °C nominal en viales. Preparar alícuotas. Retirar una alícuota por placa en el momento del uso. Inmediatamente antes del uso: diluir mezcla de anticuerpo hasta que tenga una concentración final de 4 µg/ml en Bicarbonato de sodio 50 mM frío como sigue a continuación. Por ejemplo: añadir 31 µl de mezcla de anticuerpo de revestimiento a 11.969 µl de tampón de revestimiento frío. Mezclar suavemente por inversión.

Preparación de Mezcla de anti-Proteína de célula hospedadora de cabra biotinada, 599/626/748 (n.º de lote G11202 a 0,822 mg/ml): NOTA: las soluciones de trabajo se almacenan a -80 °C nominal en viales. Preparar alícuotas. Retirar una alícuota por placa en el momento del uso. Inmediatamente antes del uso: diluir mezcla de anticuerpo biotinada hasta que tenga una concentración final de 1 µg/ml en Caseína a 37 °C ± 2 °C como sigue a continuación. Por ejemplo: añadir 14,6 µl de mezcla de anticuerpo biotinada a 11.985 µl de Caseína a 37 °C ± 2 °C. Mezclar suavemente por inversión.

Preparación de Neutravidina-HRP. Reconstituir nuevos lotes (2 mg/vial) hasta 1 mg/ml como sigue a continuación: Añadir 400 µl de agua Mili-Q al vial. A continuación añadir 1600 µl de PBS 1x, para un total de 2 ml. Agitar vorticialmente con suavidad para mezclar. Almacenar a -20 °C nominal. Preparar alícuotas con el volumen deseado de un modo tal que se use 1 alícuota por placa. Preparar en un tubo de polipropileno. Cualificar nuevos lotes para determinar la concentración de trabajo. Asignar una caducidad de 6 meses a partir de la fecha de preparación. Por ejemplo, si se ha determinado que la concentración de trabajo es de 0,2 µg/ml, entonces preparar como sigue a continuación. Inmediatamente antes de su uso: descongelar una alícuota de Neutravidina-HRP a temperatura ambiente. Diluir la solución de Neutravidina de 1 mg/ml a 0,1 mg/ml (100 µg/ml) con Caseína a 37 °C ± 2 °C. Por ejemplo, diluir 10x, añadir 50 µl de neutravidina a 450 µl de Caseína. Agitar vorticialmente con suavidad hasta conseguir mezcla. Diluir adicionalmente la solución de 100 µg/ml a 0,2 µg/ml con Caseína a 37 °C ± 2 °C. Por ejemplo, diluir 500x, añadir 24 µl de neutravidina (100 µg/ml) a 11.976 µl de Caseína. Agitar vorticialmente con suavidad hasta conseguir mezcla.

Preparación de 5.7 Ácido fosfórico 2 M (Solución de parada). Preparar una solución de Ácido fosfórico 2 M a partir de ácido fosfórico concentrado como sigue a continuación. A partir del % de ácido fosfórico indicado en la etiqueta, densidad (1,685 g/ml) y peso fórmula (98 g/mol), calcular el volumen de ácido fosfórico concentrado necesario para preparar 500 ml de ácido fosfórico 2 M. Añadir el volumen de ácido fosfórico concentrado calculado anteriormente al matraz. Llevar al volumen con agua Mili-Q y mezclar por inversión hasta obtener homogeneidad. Almacenar a temperatura ambiente durante hasta 6 meses a partir de la fecha de preparación.

Preparación de Tampón de dilución (Caseína diluida 100x en PBS 1x + Triton 100x al 0,1 %, pH 7,4). Diluir Caseína 100 x a 37 °C ± 2 °C en PBS 1x filtrado para esterilidad con un filtro de 0,22 µm + Triton 100x al 0,1 %, a un pH de 7,4 (de lo anterior). Por ejemplo: Añadir 1 ml de Caseína a 37 °C ± 2 °C a 99 ml de PBS 1x filtrado para esterilidad con un filtro de 0,22 µm + Triton 100x al 0,1 %, a un pH de 7,4. Mezclar bien, preparar reciente para cada uso.

Preparación de Estándares. Estándares de proteínas de célula hospedadora (Estándares de antígeno) (n.º de lote G11203 a 1,218 mg/ml): NOTA: las soluciones de trabajo se almacenan a -80 °C nominal en alícuotas de 70 µl. Descongelar una alícuota a temperatura ambiente. Realizar diluciones seriadas en tubos de polipropileno usando Tampón de dilución.

Preparación de Muestras. En tubos de polipropileno, diluir muestras globales finales a 24 mg/ml en Tampón de dilución. Registrar la concentración. NOTA: usar las soluciones posteriores para preparar muestras enriquecidas y preparar las soluciones de 12 mg/ml a las que se hace referencia posteriormente. En microtubos de polipropileno, diluir adicionalmente las soluciones de 24 mg/ml a 12 mg/ml en Tampón de dilución. Cargar pocillos por triplicado para cada una de las soluciones de 12 mg/ml en la placa para un total de 6 pocillos.

Preparación de Enriquecimiento. En un microtubo de polipropileno, preparar un enriquecimiento de Proteínas de célula hospedadora de 10 ng/ml a partir del estándar de 20 ng/ml preparado anteriormente por dilución del mismo 2x con Tampón de dilución. Cargar tres pocillos para la solución de enriquecimiento de 10 ng/ml en la placa. Usar la solución de estándar de 20 ng/ml de la etapa 6.1 para enriquecer las muestras.

Preparación de Muestras enriquecidas. En microtubos de polipropileno, enriquecer 300 µl de cada solución global final de 24 mg/ml con 300 µl de la solución de enriquecimiento de 20 ng/ml (6.1). Cargar los pocillos por triplicado para cada solución de muestra enriquecida para un total de 6 pocillos.

Preparación de Control. Se debe establecer un intervalo de control para cada nueva solución de trabajo de control,

antes de su uso en el ensayo de rutina. Solución de trabajo de control: preparar alícuotas de 150 µl de un lote de Concentrado de sustancia farmacológica ABT-308 y almacenar congelado a -80 °C nominal durante hasta tres años.

5 Preparación de Control de trabajo. Descongelar una alícuota de control a temperatura ambiente. En tubos de polipropileno, diluir el control a 24 mg/ml con Tampón de dilución. En microtubos de polipropileno, diluir adicionalmente la solución de control de 24 mg/ml con tampón de dilución a 12 mg/ml. Preparar una dilución individual y cargar el control en 3 pocillos de la placa.

10 Procedimientos de ELISA. Llenar la botella de lavado de la placa con tampón de lavado de placa (véase la etapa 5.3 PBS 1x + Triton X-100 al 0,1 %). Cebarr el lavador de la placa. Comprobar los siguientes parámetros: Los parámetros se deberían establecer en: Tipo de placa: 1 Para cada ciclo (un total de 5 ciclos): Volumen: 400 µl; Tiempo de remojo: 10 segundos; Tiempo de asp.: 4 segundos.

15 Procedimiento de ensayo. Revestir placas con 100 µl/pocillo de mezcla de anticuerpo de revestimiento de cabra de 4 µg/ml en Bicarbonato de sodio 50 mM frío. Golpear suavemente el lado de la placa hasta que la solución de revestimiento cubra el fondo de los pocillos uniformemente, cubrir con cinta de sellado e incubar a 4 °C nominal mientras se agita en el agitador de placas (o equivalente) a velocidad 3 durante 18 horas ± 1 hora. Después de incubación durante una noche, retirar la placa del refrigerador y dejar que se equilibre a temperatura ambiente. Agitar el revestimiento. Secar la placa con toallas de papel. Bloquear con 300 µl/pocillo de Caseína a 37 °C ± 2 °C, cubrir con cinta de sellado e incubar a 37 °C ± 2 °C mientras se agita con un agitador de placas Lab-line Environ (o equivalente a 80 rpm ± 5 rpm durante una hora. Preparar estándar, muestra, control, enriquecimiento, y muestras enriquecidas durante la incubación de bloqueo. Lavar la placa 5 veces con Tampón de lavado. Secar la placa con toallas de papel. Usar una pipeta de 8 canales, pipetear 100 µl/pocillo de estándares, muestras, enriquecimientos, muestras enriquecidas, y control en pocillos por triplicado de la placa. Pipetear 100 µl/pocillo de Tampón de dilución en todos los pocillos vacíos de la placa para servir como blancos. Cubrir con cinta de sellado e incubar a 37 °C ± 2 °C mientras se agita con un agitador de placas Lab-line Environ (o equivalente) a 80 rpm ± 5 rpm durante 1 hora. Rellenar una plantilla para usar como guía cuando se cargue la placa.

30 Configuración del lector de placas. Configurar la plantilla, introduciendo las concentraciones de los estándares. No introducir los factores de dilución para las muestras, control, enriquecimiento, o enriquecidas. Asignar los pocillos que contienen diluyente a blancos que se restan de todos los pocillos. Lavar la placa 5 veces con Tampón de lavado. Secar la placa con toallas de papel. Añadir 100 µl/pocillo de anticuerpo de cabra biotinado. Cubrir con cinta de sellado e incubar a 37 °C ± 2 °C mientras se agita con un agitador de placas Lab-line Environ (o equivalente) a 80 rpm ± 5 rpm durante 1 hora. Lavar la placa 5 veces con Tampón de lavado. Secar la placa con toallas de papel. Añadir 100 µl/pocillo de solución de conjugado de Neutravidina-HRP. Cubrir con cinta de sellado e incubar a 37 °C ± 2 °C mientras se agita con un agitador de placas Lab-line Environ (o equivalente) a 80 rpm ± 5 rpm durante 1 hora. Lavar la placa 5 veces con Tampón de lavado. Secar la placa con toallas de papel. Añadir 100 µl/pocillo de sustrato K-Blue frío, cubrir con cinta de sellado e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos (comenzar a contar tan pronto como el sustrato se añada a la primera fila), mientras se agita a velocidad 3 en un agitador de placas Lab-line Environ (o equivalente). Detener la reacción por adición de 100 µl/pocillo de Ácido fosfórico 2 M (Etapa 5.7). Poner la placa en un agitador de placas a velocidad 3 durante 3-5 minutos. Leer la placa a 450 nm.

45 Análisis de datos y cálculos. NOTA: solo se aceptan muestras, enriquecimientos, muestras enriquecidas, y control, con densidades ópticas que entren dentro del límite de cuantificación práctico (estándar de 2,5 ng/ml) de la curva de estándares y que cumplan con los criterios de % CV o % de diferencia que se establecen posteriormente. Si la DO de la muestra es inferior al estándar de 2,5 ng/ml, el resultado se debería informar como menor que 2,5 ng/ml. A continuación este valor se debería dividir por la concentración de muestra diluida (12 mg/ml) para informar el valor en ng/mg. Si la muestra tiene una elevada concentración de célula hospedadora que causa que la muestra no enriquecida y/o la muestra enriquecida estén por encima de la curva de estándares, informar el valor como > 100 ng/ml. A continuación este valor se debería dividir por la concentración de muestra diluida (12 mg/ml) para informar el valor en ng/mg. Considerar el valor cero de muestra para los cálculos de recuperación de enriquecimiento cuando la muestra es inferior al estándar de 2,5 ng/ml.

55 Curva de estándares. Las concentraciones de los estándares se deberían introducir en la plantilla del protocolo. Se usa un ajuste de curva cuadrático. El coeficiente de determinación debería ser = 0,99 y el % CV entre pocillos por triplicado debería ser = 20 %. Si este criterio no se cumple: se debe rechazar un estándar (1 nivel, 3 pocillos). Si se rechaza el 1,25 ng/ml, solo son aceptables las muestras y las muestras enriquecidas con densidades ópticas que entran dentro de las densidades ópticas de 2,5 ng/ml y 100 ng/ml (los puntos de la curva de estándares restantes). Además, para los triplicados de cada nivel de estándar, si un pocillo individual está claramente contaminado o muestra baja unión, se puede rechazar. Si se rechaza un pocillo de un nivel de estándar, los replicados restantes deben tener un % de diferencia = 20 %. El % CV para el estándar más bajo, que muestra valores de DO cercanos al fondo (blancos) de la placa debería ser = 30 %. Si se rechaza un pocillo, el % de diferencia para los replicados restantes debe ser = 35 %. Si se rechaza el estándar más bajo, solo son aceptables las muestras y las muestras enriquecidas con densidades ópticas que entran dentro de las densidades ópticas del nivel de curva de estándares restante.

65

Muestras. % CV debería ser = 20 % entre pocillos por triplicado. Informar % CV entre pocillos por triplicado. Se puede rechazar un pocillo de cada dilución de muestra. Los replicados restantes deben tener un % de diferencia = 20 %. Nota: si DO de una muestra no enriquecida es inferior a DO del estándar de 2,5 ng/ml el criterio de % de diferencia no se aplica a los resultados no enriquecidos. Véase el cálculo indicado anteriormente.

5 Calcular la Concentración de célula hospedadora real en ng/mg a partir del valor medio (ng/ml) como sigue a continuación: Proteínas de célula hospedadora CHO (ng/ml) = Media "Resultado de muestra no enriquecida (ng/ml)"_ Concentración de muestra diluida (12 mg/ml).

10 Enriquecimientos. % CV debería ser = 20 % entre los pocillos por triplicado. Registrar % CV. Se puede rechazar un pocillo del enriquecimiento. Los puntos restantes deben tener un % de diferencia = 20 %. Véase el cálculo indicado anteriormente. Informar la concentración de célula hospedadora en ng/ml. Este resultado se usará en los cálculos de recuperación de enriquecimiento. La concentración resultante para el enriquecimiento (ng/ml) debe ser $\pm 20\%$ de la concentración de enriquecimiento teórica. Registrar el resultado e indicar Aprobado o No aprobado. Si el resultado de enriquecimiento no está dentro del 20 % teórico, el ensayo se debe repetir. Concentración de enriquecimiento media (ng/ml) x 100 = debe ser 100 % $\pm 20\%$ 10 ng/ml.

20 Muestras enriquecidas. % CV debería ser = 20 % entre los pocillos por triplicado. Registrar % CV entre los pocillos por triplicado. Se puede rechazar un pocillo de cada dilución de muestra enriquecida. Los replicados restantes deben tener un % de diferencia de = 20 %. Véase el cálculo indicado anteriormente. Informar "Resultado de muestra enriquecida) para cada dilución en ng/ml. Registrar el % de diferencia entre las diluciones por duplicado. El % diferencia entre las diluciones debería ser = 25 %. Estos resultados se usarán en los cálculos de recuperación de enriquecimiento.

25 Calcular el % de Recuperación de enriquecimiento para cada conjunto de diluciones usando la siguiente fórmula: % de Recuperación de enriquecimiento = Valor de muestra enriquecida - Valor de muestra no enriquecida x 100 Valor de enriquecimiento. NOTA: (1) Si DO del valor de una muestra no enriquecida es inferior al estándar de 2,5 ng/ml considerar el valor como cero en el cálculo del % de recuperación de enriquecimiento. % de Recuperación de enriquecimiento debe ser 100 % $\pm 50\%$ (50 % -150 %) para cada dilución para cada muestra. Registrar los resultados y Aprobado/No aprobado.

30 Control. % CV debería ser = 20 % entre los pocillos por triplicado. Registrar el resultado de % CV. Se puede rechazar un pocillo del control. Los replicados restantes deben tener un % diferencia de = 20 %. Véase el cálculo indicado anteriormente. Informar la concentración de Célula hospedadora en el control en ng/ml. Calcular la concentración de Célula hospedadora en ng/ml como sigue a continuación: Proteína de célula hospedadora (ng/ml) = resultado de Proteína de célula hospedadora de control en ng/ml.

4. Determinación de la concentración de Proteína A en las composiciones de anticuerpo

40 En este ELISA, las placas se revisten con anti-Proteína A de pollo y se incuban. Se bloquean los sitios no específicos con caseína en PBS. Las placas se lavan en PBS 1x + Triton X-100 al 0,1 % para retirar el material no unido. Las muestras y los estándares de Cysrproteína A se diluyen en PBS 1x + Triton X al 4,1 % + Caseína al 10 %. Las soluciones se desnaturalizan por calentamiento a 95 °C $\pm 2^\circ$ C, para separar la Proteína A del anticuerpo. En ciertas realizaciones, por ejemplo si (GE Healthcare) las soluciones se añaden a continuación a la placa y se incuban. En realizaciones alternativas, por ejemplo, si la etapa de afinidad de Proteína A incluye el uso de ProSep Ultra Plus™ (Millipore), las soluciones se enfrían y se añade NaCl al 0,85 % + ácido acético 1 N al 12,5 % + Tween 20 al 0,1 % a cada tubo (1:1) para ayudar adicionalmente en la separación de la Proteína A de la proteína de muestra. Los tubos se agitan vorticialmente de forma vigorosa, se incuban y se centrifugan. Los sobrenadantes se retiran y se procesan adicionalmente. El material no unido se retira por lavado con PBS 1x + Triton X-100 al 0,1 %.

50 Se añade anti-Proteína A de pollo biotinado a la placa de microtitulación y se incuba. La placa se lava para retirar el material no unido y se añade conjugado Neutravidina-Peroxidasa.

La Neutravidina se unirá al anti-Proteína A de pollo biotinado que se ha unido a los pocillos. La placa se lava de nuevo para retirar la Neutravidina y se añade sustrato K-Blue (tetrametilbencidina (TMB)) a la placa. El sustrato se hidroliza mediante la Neutravidina unida para producir un color azul. La reacción se detiene con Ácido fosfórico, cambiando el color a amarillo. La intensidad del color amarillo en los pocillos es directamente proporcional a la concentración de Proteína A presente en los pocillos.

60 Preparación de Reactivos y Soluciones. Las botellas de caseína se deben calentar a 37 °C $\pm 2^\circ$ C; se someten a ultrasonidos durante 2 minutos, y se alicuotan. Las alícuotas se han de almacenar a 4 °C nominal. Cuando se va a llevar a cabo el ensayo, se debería poner el número de alícuotas de caseína necesario a 37 °C $\pm 2^\circ$ C. El tampón de revestimiento y el sustrato se usan fríos (tomados de 4 °C nominal justo antes de su uso).

65 Bicarbonato de sodio 50 mM (Tampón de revestimiento), pH 9,4. A un vaso de precipitados de 1 l añadir: 900 ml de agua Mili-Q y 4,20 g $\pm 0,01$ g de Bicarbonato de sodio. Agitar hasta disolver completamente. Ajustar el pH a 9,4 con NaOH 1 N. Transferir a un matraz volumétrico de 1 l y llevar al volumen con agua Mili-Q. Mezclar por inversión hasta

obtener homogeneidad. Filtrar a través de una unidad de filtración estéril de 0,22 CA μm . Almacenar a 4 °C nominal durante hasta 7 días desde la fecha de preparación.

5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 104 M, NaCl 1,37 M, KCl 0,027 M, KH_2PO_4 0,0176 M, pH = 6,8 - 6,9. (PBS 10x): Añadir aproximadamente 400 ml de agua Mili-Q a un vaso de precipitados de vidrio. Añadir 13,94 g \pm 0,01 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Añadir 40,0 g \pm 0,1 g de NaCl. Añadir 1,00 g \pm 0,01 g de KCl. Añadir 1,20 g \pm 0,01 g de KH_2PO_4 . Agitar hasta obtener homogeneidad. Transferir a un matraz volumétrico de 500 ml. Añadir c.s. hasta un volumen de 500 ml con agua Mili-Q. Mezclar por inversión. Filtrar a través de una unidad de filtración estéril 0,2 CA μm . Almacenar a temperatura ambiente durante hasta 7 días.

10 PBS 1x + Triton X-100 al 0,1 %, pH 7,40: (Tampón de lavado de placa). En un cilindro graduado de 4 l, mezclar 400 ml de PBS 10x (véase anteriormente) con 3500 ml de agua Mili-Q. Comprobar el pH, y ajustar si fuera necesario a 7,40 \pm 0,05 con HCl 1 N o NaOH 1 N. Llevar al volumen con agua Mili-Q. Tapar firmemente con Parafilm el cilindro y mezclar por inversión hasta obtener homogeneidad. Transferir a una botella de 4 l. Retirar 4 ml del PBS 1x y desechar. Añadir 4 ml de triton X-100 a los 3996 ml de PBS 1x. Poner en la placa de agitación y agitar hasta disolver completamente. Almacenar a temperatura ambiente durante hasta 7 días.

20 Anticuerpo de revestimiento anti-Proteína A de pollo. Sacar una alícuota de anticuerpo por placa en el momento del uso. Para cualificar nuevos lotes de anti-Proteína A de pollo, puede ser necesario usar y cualificar conjugado anti-Proteína A de pollo-Biotina (preparado a partir del mismo lote de revestimiento) conjuntamente. Inmediatamente antes de su uso: diluir la mezcla de anticuerpo en Bicarbonato de sodio 50 mM frío a la concentración determinada durante la cualificación del revestimiento. Por ejemplo: si durante la cualificación la concentración de revestimiento para cargar en la placa se determina que es 6 $\mu\text{g/ml}$ y si la concentración de trabajo es 3000 $\mu\text{g/ml}$, entonces añadir 24 μl de anticuerpo de revestimiento a 11.976 μl de tampón de revestimiento frío. Mezclar suavemente por inversión.

25 Anti-Proteína A de pollo biotinado. Sacar una alícuota del anticuerpo por placa en el momento del uso. Para cualificar nuevos lotes de conjugado anti-Proteína A de pollo-Biotina, puede ser necesario usar y cualificar el mismo con el mismo lote de anti-Proteína A de pollo a partir de que se preparó. Inmediatamente antes de su uso: diluir el anticuerpo biotinado en Caseína a 37 °C \pm 2 °C a la concentración determinada durante la cualificación del anticuerpo biotinado. Por ejemplo: si durante la cualificación la concentración de anticuerpo biotinado que se carga en la placa se determinó que era 4 $\mu\text{g/ml}$ y si la concentración de trabajo es 100 $\mu\text{g/ml}$, entonces añadir 48 μl de anticuerpo biotinado a 11.952 μl de Caseína a 37 °C \pm 2 °C. Mezclar suavemente por inversión.

35 Neutravidina-HRP. Reconstituir nuevos lotes (2 mg/vial) hasta 1 mg/ml como sigue a continuación: Añadir 400 μl de agua Mili-Q al vial, a continuación añadir 1600 μl de PBS 1x, para un total de 2 ml. Agitar vorticialmente con suavidad para mezclar. Almacenar a -80 °C nominal. Preparar alícuotas con el volumen deseado de un modo tal que se use 1 alícuota por placa. Preparar en un tubo de polipropileno. Asignar una caducidad de 6 meses a partir de la fecha de preparación. Por ejemplo, si se ha determinado que la concentración de trabajo es de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, entonces preparar como sigue a continuación. Inmediatamente antes de su uso, descongelar una alícuota de Neutravidina-HRP a temperatura ambiente. Diluir la solución de Neutravidina de 1 mg/ml a 0,01 mg/ml (10 $\mu\text{g/ml}$) con Caseína a 37 °C \pm 2 °C, XIO de nuevo, añadir 100 μl de neutravidina 10x a 900 μl de Caseína. Agitar vorticialmente con suavidad hasta conseguir mezcla. Diluir adicionalmente la solución de 10 $\mu\text{g/ml}$ a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ con Caseína a 37 °C \pm 2 °C. Por ejemplo, diluir 100x, añadir 120 μl de neutravidina (10 $\mu\text{g/ml}$) a 11.880 μl de Caseína. Invertir varias veces con suavidad para mezclar.

45 Solución de parada (se usa Ácido fosfórico 1 N adquirido comercialmente). Almacenar a temperatura ambiente durante hasta 1 año desde la fecha de recepción. Tampón de dilución (PBS 1x + Triton X100 al 4,1 % + Caseína al 10 %, pH 7,4). Añadir 86 ml de PBS 1x + Triton X100 al 0,1 %, a un pH de 7,4 (de la Etapa 5.3) a un vaso de precipitados o un matraz, añadir 4 ml de Triton X-100, y 10 ml de Caseína bloqueadora en PBS, y agitar para disolver/mezclar. Puede tardar de 20 a 30 minutos disolver el Triton. Esto equivale a una solución de PBS 1x + Triton X100 al 4,1 % + Caseína al 10 %, pH 7,4. Filtrar a través de una unidad de filtración estéril de 0,22 CA μm . Preparar reciente para cada uso. Esto es suficiente para 1 placa.

55 Estándares de Proteína A (Estándares de antígeno). NOTA: las soluciones de trabajo se almacenan a -20 °C nominal en alícuotas de 70 μl . Descongelar una alícuota en hielo. Realizar diluciones seriadas de acuerdo con los ejemplos en la Tabla posterior en tubos de polipropileno usando Tampón de dilución (véase anteriormente) usando la concentración indicada en el COA de los fabricantes: por ejemplo, si el COA indica que la concentración de trabajo es 2,1 mg/ml (2100000 ng/ml), entonces: descongelar muestras en hielo. En tubos de microcentrifuga de propileno, diluir muestras globales finales a 20 mg/ml en Tampón de dilución (véase anteriormente). Llevar a cabo 2 diluciones separadas. Registrar la concentración. Usar las soluciones posteriores para preparar muestras enriquecidas y para preparar las soluciones de 10 mg/ml. Por ejemplo: Cone. (mg/ml) Vol. μl de X mg/ml solución Vol. de diluyente (μl) Dilución seriada de muestra de trabajo 120. En tubos de microcentrifuga de polipropileno, diluir además las soluciones de 20 mg/ml a 10 mg/ml en Tampón de dilución.

65 Preparación de Enriquecimiento. En un tubo de microcentrifuga de polipropileno, preparar un enriquecimiento de Proteína A de 0,296 ng/ml a partir del estándar de 0,593 ng/ml preparado anteriormente en la Etapa 6.1 por dilución

ES 2 813 398 T3

del mismo 2x con Tampón de dilución. Llevar a cabo una dilución individual. Se cargarán pocillos por triplicado para la solución de enriquecimiento de 0,296 ng/ml en la placa. Usar la solución de estándar de 0,593 ng/ml de la Etapa 6.1 para el enriquecimiento de muestras.

5 Preparación de Muestras enriquecidas. En tubos de microcentrífuga de polipropileno, enriquecer 500 µl de cada solución global final de 20 mg/ml con 500 µl de la solución de enriquecimiento de 0,593 ng/ml. Mantener para desnaturalización. Se cargarán pocillos por triplicado para cada solución de muestra enriquecida en la placa para un total de 6 pocillos.

10 Preparación de Control. Obtener un lote de Sustancia farmacológica ABT-308. Preparar alícuotas de 150 µl y almacenar congeladas a -80 °C nominal durante tres años desde la fecha de alícuotado.

Control de trabajo: descongelar una alícuota de control en hielo. En un tubo de microcentrífuga de polipropileno, diluir el control hasta 10 mg/ml con Tampón de dilución para tener un volumen final de 1000 µl. Preparar una dilución individual. Mantener para desnaturalización. Se cargarán pocillos por triplicado de control en la placa.

Desnaturalización. Para los blancos de la placa, añadir 1000 µl de tampón de dilución a un número de tubos de microcentrífuga igual al número de blancos que se van a procesar en la placa. Los tapones de los tubos se pueden cerrar con Parafilm para prevenir que queden abiertos durante el calentamiento o se puede poner una segunda bandeja en la parte superior de los mismos para mantener los tapones cerrados. Calentar los estándares, muestras no enriquecidas, muestras enriquecidas, enriquecimiento, blancos, y control a 95 °C ± 2 °C durante 15 minutos. Retirar el Parafilm de los tubos durante el enfriamiento, si se llegó a usar. Dejar enfriar durante 15 minutos, y centrifugar durante 5 minutos a aproximadamente 10.000 rpm. Transferir 700 µl del sobrenadante a los microtubos para cargar en la placa. Tener cuidado de no alterar el sedimento de Triton/proteína.

25 Instrucciones del lavador de placa y configuración del baño de agua. Llenar la botella de lavado de placa con tampón de lavado de placa (véase la Etapa 5.3, PBS 1x + Triton X-100 al 0,1 %). Cebear el lavador de placas. Comprobar los siguientes parámetros: parámetros que se deberían ajustar: Tipo de placa: 1 para cada ciclo (un total de 4 ciclos): Velocidad de asp.: 10 mm/s; Volumen: 400 µl; Tiempo de remojo: 5 segundos; Tiempo de asp.: 6 segundos.

30 Conectar el baño de agua y ajustarlo a 95 °C. Dejar que la temperatura del baño de agua se equilibre a 95 °C ± 2 °C durante al menos 30 minutos.

Procedimiento de ensayo: se puede usar una lista de control como guía para comprobar las etapas que se completan. Además, registrar todo el equipo usado durante el ensayo. La cantidad de alícuotas de Caseína que se usan para cada día para el ensayo que se va llevar a cabo se deben poner a 37 °C ± 2 °C. El Tampón de revestimiento y el sustrato se usan fríos. Preparar el estándar, muestra, control, enriquecimiento, y muestras enriquecidas antes de y durante la incubación de bloqueo. Se puede tardar más de la incubación de bloqueo de 1 hora en preparar diluciones, transferir a tubos Eppendorf, desnaturalizar durante 15 minutos, enfriar durante 15 minutos, centrifugar durante 5 minutos, y transferir a microtubos. Dejar al menos 40 minutos antes de bloquear las placas. Las muestras, muestras enriquecidas, estándares, control, enriquecimiento de ensayo, y blancos se cargan en la placa horizontalmente desde la columna B a la G usando una pipeta de 12 canales. Los estándares se cargan de mayor a menor concentración. El revestimiento de la placa, la adición de biotina, la adición de neutravidina, la adición de sustrato, y la adición de solución de parada se realizan verticalmente de la columna 2 a la 11.

45 Revestir las placas con 100 µl/pocillo de anticuerpo de revestimiento en Bicarbonato de sodio 50 mM frío. Golpear suavemente el lado de la placa hasta que la solución de revestimiento cubra el fondo de los pocillos uniformemente, cubrir con una cinta de sellado e incubar a 4 °C nominal mientras se agita en un agitador de placas (o equivalente) a velocidad 3.

50 Después de incubación durante una noche, retirar la placa del refrigerador y dejar que se equilibre a temperatura ambiente. Retirar el revestimiento mediante sacudidas. Secar la placa con toallas de papel. Bloquear con 300 µl/pocillo de Caseína a 37 °C ± 2 °C, cubrir con una cinta de sellado e incubar a 37 °C ± 2 °C mientras se agita en un agitador de placas Lab-line Environ (o equivalente) a 80 rpm ± 5 rpm durante 1 hora ± 10 minutos.

55 Preparar el estándar, muestra, control, enriquecimiento, y muestras enriquecidas antes de y durante la incubación de bloqueo. Lavar la placa 4 veces con Tampón de lavado. Secar la placa en toallas de papel. Usar una pipeta de 8 canales, pipetear 100 µl/pocillo de estándares desnaturalizados, muestras, enriquecimientos, muestras enriquecidas, blancos, y control en pocillos por triplicado de la placa. Los pocillos exteriores de la placa no se usan, añadir tampón de dilución no tratado a estos pocillos. Cubrir con una cinta de sellado e incubar a 37 °C ± 2 °C mientras se agita en un agitador de placas Lab-line Environ (o equivalente) a 80 rpm ± 5 rpm durante 2 horas. Rellenar una plantilla para usar como guía cuando se cargue la placa.

60 Configuración del lector de placas. Lavar la placa 4 veces con Tampón de lavado. Secar la placa en toallas de papel.

65 Añadir 100 µl/pocillo de anticuerpo biotinado. Cubrir con cinta de sellado e incubar a 37 °C ± 2 °C mientras se agita en un agitador de placas Lab-line Environ (o equivalente) a 80 rpm ± 5 rpm durante 1 hora.

Lavar la placa 4 veces con Tampón de lavado. Secar la placa en toallas de papel. Añadir 100 µl/pocillo de solución de conjugado Neutravidina-HRP. Comenzar a contar el tiempo tan pronto como se añada la neutravidina a la última fila. Cubrir con cinta de sellado e incubar a 37 °C ± 2 °C mientras se agita en un agitador de placas Lab-line Environ (o equivalente) a 80 rpm ± 5 rpm durante 30 minutos. Lavar la placa 4 veces con Tampón de lavado. Secar la placa en toallas de papel. Añadir 100 µl/pocillo de sustrato K-Blue frío, cubrir con cinta de sellado e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos (comenzar a contar el tiempo tan pronto como se haya añadido el sustrato a la primera fila), mientras se agita a velocidad 3 en un agitador de placas Lab-line Environ (o equivalente). Detener la reacción por adición de 100 µl/pocillo de Ácido fosfórico 1 N. Poner la placa en un agitador de placas a velocidad 3 durante 3 minutos. Leer la placa a 450 nm.

Análisis de datos y cálculos. NOTA: solo se aceptan muestras, enriquecimientos, muestras enriquecidas, y control, con densidades ópticas que entran dentro del límite de cuantificación práctico de la curva de estándares y que cumplen con los criterios de % CV o % de diferencia que se indican posteriormente. Si DO de la muestra está por debajo de la curva de estándares, el resultado se debería informar como menor que 0,18 ng/ml (LOQ del ensayo). Este valor se debería dividir a continuación por la concentración de la muestra diluida (10 mg/ml) para informar el valor en ng/mg. Si la muestra tiene una alta concentración de Proteína A que hace que la muestra no enriquecida y/o la muestra enriquecida sean mayores que la curva de estándares (2 ng/ml), entonces diluir adicionalmente para que entre dentro de la curva de estándares. A continuación, este valor se debería dividir por la concentración de la muestra diluida para informar el valor en ng/mg. Para cálculos de recuperación de enriquecimiento, restar el valor de la muestra no enriquecida (ng/mg) del valor de la muestra enriquecida (ng/mg) incluso cuando el valor de la muestra no enriquecida (ng/mg) esté por debajo de la curva. Si el valor es negativo o se obtiene un "intervalo", considerar en ese caso la muestra no enriquecida como cero para los cálculos de recuperación de enriquecimiento.

Curva de estándares. Las concentraciones de los estándares se deberían introducir en la plantilla del protocolo. Se usa un ajuste de curva cuadrática. El coeficiente de determinación debe ser = 0,99 y % CV entre los pocillos por triplicado debe ser = 20 %. Si este criterio no se cumple: se puede rechazar un estándar (1 nivel, 3 pocillos). Si se rechaza el de 0,18 ng/ml, solo son aceptables muestras y muestras enriquecidas con densidades ópticas que entran dentro de las densidades ópticas de 0,26 ng/ml y 2 ng/ml (los puntos de la curva de estándares restantes). Además, para los triplicados de cada nivel de estándar, si un pocillo individual está claramente contaminado o muestra una baja unión, se puede rechazar. Si se rechaza un pocillo de un nivel de estándar, los replicados restantes deben tener un % de diferencia = 20 %. El % CV para el estándar más bajo, que muestra valores de DO cercanos al fondo (blancos) de la placa, debería ser = 30 %. Si se rechaza un pocillo, el % de diferencia para los replicados restantes del ser = 35 %. Si se rechaza el estándar más bajo, solo son aceptables las muestras y muestras enriquecidas con densidades ópticas que entran dentro de las densidades ópticas de los niveles de curva de estándares restantes.

Calcular % de Diferencia como sigue a continuación: % de Diferencia = (Abs. (resultado dilución 1 - resultado dilución 2)/valor medio) x 100 %. El ensayo se debe repetir si los estándares no cumplen con los criterios anteriores. Informar los valores de % CV y/o % de diferencia y el Coeficiente de la curva de estándares de resultados de determinación.

Muestras. % CV debería ser = 20 % entre los pocillos por triplicado. Informar % CV entre pocillos por triplicado. Se puede rechazar un pocillo de cada muestra de dilución. Los replicados restantes deben tener un % de diferencia de = 20 %. Nota: si la DO de la muestra no enriquecida está por debajo de la DO del estándar más bajo, el criterio de % de diferencia no se aplica a los resultados no enriquecidos: véase el cálculo anterior.

Informar "Resultado de muestra no enriquecida" para cada dilución en ng/ml. Estos valores se usarán en los cálculos de recuperación de enriquecimiento. Calcular el "Resultado de muestra no enriquecida (ng/ml)" medio y el % de diferencia entre las diluciones. Informar los resultados. % De diferencia entre las diluciones debe ser = 25 %. Calcular la Concentración de Proteína A real en ng/ml a partir del valor medio (ng/ml) como sigue a continuación: Proteína A (ng/mg) = "Resultado de muestra no enriquecida (ng/ml)" medio Concentración de muestra diluida (10 mg/ml). Registrar el resultado.

Enriquecimientos. % CV debería ser = 20 % entre los pocillos por triplicado. Registrar % CV. Se puede rechazar un pocillo del enriquecimiento. Los puntos restantes deben tener un % de diferencia = 20 %. Véase el cálculo anterior. Informar la concentración de Proteína A en ng/ml. Este resultado se usará en los cálculos de recuperación de enriquecimiento. La concentración resultante para el enriquecimiento (ng/ml) debe ser ± 20 % de la concentración de enriquecimiento teórica. Registrar el resultado e indicar Aprobado o No aprobado. Si el resultado de enriquecimiento no está dentro del 20 % del valor teórico, el ensayo se debe repetir. Concentración de enriquecimiento media (ng/ml) x 100 = debe ser 100 % ± 20 % 0,296 ng/ml.

Muestras enriquecidas. % CV debería ser = 20 % entre los pocillos por triplicado. Registrar % CV entre pocillos por triplicado. Se puede rechazar un pocillo de cada dilución de muestra enriquecida. Los replicados restantes deben tener un % de diferencia de = 20 %. Véase el cálculo anterior. Informar "Resultado de muestra enriquecida" para cada dilución en ng/ml. Registrar % de diferencia entre las diluciones por duplicado. El % de diferencia entre las diluciones debería ser = 25 %. Estos resultados se usarán en los cálculos de la recuperación de enriquecimiento.

Calcular % de Recuperación del requisamiento para cada conjunto de diluciones usando la siguiente fórmula: % de Recuperación de enriquecimiento = Valor de muestra enriquecida - Valor de muestra no enriquecida x 100. Valor de enriquecimiento NOTA: para los cálculos de recuperación de enriquecimiento, restar el valor de la muestra no enriquecida (ng/ml) del valor de la muestra enriquecida (ng/ml) incluso cuando el valor de la muestra no enriquecida (ng/ml) esté por debajo de la curva. Si el valor es negativo o se obtiene un "intervalo", considerar en ese caso la muestra no enriquecida como cero para los cálculos de recuperación de enriquecimiento. % de Recuperación de enriquecimiento debe ser 100 % ± 50 % (50 % - 150 %) para cada dilución para cada muestra. Registrar los resultados y Aprobado/No aprobado.

- 5
- 10 Control. % CV debería ser = 20 % entre los pocillos por triplicado. Registrar el resultado de % CV. Se puede rechazar un pocillo del control. Los replicados restantes deben tener un % de diferencia de = 20 %.

Tabla 9. Resultados de los ensayos de Proteína de célula hospedadora residual y Proteína A

| N.º de lote | Proteína A (ng/mg) | Proteína de célula hospedadora (ng/mg) |
|-------------|--------------------|--|
| 56003BF | 1,01 | < 0,14 |
| 57001BF | 1,58 | < 0,14 |
| 57002BF | 1,68 | < 0,14 |
| 88018BF | < 0,29 | < 0,14 |
| 89001BF | < 0,29 | < 0,14 |
| 90006BF | < 0,29 | < 0,14 |
| 90009BF | < 0,29 | < 0,14 |

Tabla 10. Resultados de los ensayos de Proteína de célula hospedadora residual y Proteína A: Muestras en el proceso

| N.º de lote | Etapa de proceso | | | | | |
|-------------|--------------------|-------------|----------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| | Proteína A | | Intercambio aniónico | | Interacción hidrófoba | |
| | Proteína A (ng/mg) | HCP (ng/mg) | Proteína A (ng/mg) | HCP (ng/mg) | Proteína A (ng/mg) | HCP (ng/mg) |
| 88018BF | 9,55 | 768 | 0,79 | 4 | 0,17 | ≤ 0,120 |
| 89001BF | 8,64 | 797 | 0,41 | 3 | 0,11 | ≤ 0,128 |
| 90006BF | 9,67 | 914 | 0,50 | 3 | 0,16 | ≤ 0,118 |
| 90009BF | 7,86 | 798 | 0,50 | 3 | 0,18 | ≤ 0,124 |

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una preparación de anticuerpo anti-IL-13 reducido en proteínas de célula hospedadora (reducido en HCP) a partir de una mezcla de muestra que comprende un anticuerpo anti-IL-13 y al menos una HCP, comprendiendo dicho método:
- (a) filtrar dicha mezcla de muestra con un filtro de filtración en lecho profundo y recoger una mezcla de muestra filtrada en lecho profundo;
- (b) poner en contacto dicha mezcla de muestra filtrada en lecho profundo con una resina de cromatografía de afinidad a Proteína A, lavando dicha resina de cromatografía de afinidad con un tampón que comprende Tris 25 mM, NaCl 100 mM, a pH 7,2, seguido de un lavado con un tampón que comprende citrato de sodio/ácido cítrico 20 mM, NaCl 0,5 M, a pH 6, y a continuación con un tampón que comprende Tris 25 mM, NaCl 100 mM, a pH 7,2 y recoger una muestra de cromatografía de afinidad;
- (c) someter dicha muestra de cromatografía de afinidad a una reducción en el pH para formar de ese modo una muestra de pH reducido, en el que dicha muestra de pH reducido tiene un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 4;
- (d) ajustar el pH de dicha muestra de pH reducido a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8,5 y poner en contacto dicha muestra de pH ajustado con una resina de intercambio aniónico que comprende un sustituyente aniónico aminoetilo cuaternario (QAE) y recoger una muestra de intercambio iónico; y
- (e) poner en contacto dicha muestra de intercambio iónico con un material de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y recoger una muestra de HIC, en el que dicha muestra de HIC comprende dicha preparación de anticuerpo reducida en HCP,
- en el que aproximadamente se refiere a un 20 % mayor que o menor que el valor referenciado, y en el que dicho anticuerpo anti-IL-13 es un anticuerpo IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₄, o IgM humanizado que comprende una región variable de cadena pesada de
EVTLRESGPGVLKPTQTLTLTCTLYGFSLSLSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDVKRYN
PALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPVDTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGTLLVTVSS y una región variable de cadena ligera de
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVISCRAQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIFYTSKLSHSGVPSRFSG
SGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPLTFGGGTKVEIK.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha reducción en el pH en la etapa (c) se consigue mezclando un ácido adecuado con dicha mezcla de muestra, opcionalmente en el que dicho ácido adecuado se selecciona entre el grupo que consiste en ácido cítrico, ácido acético, y ácido caprílico.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho material de HIC es:
- (i) una columna de HIC cuya fase estacionaria comprende grupos hidrófobos, o
- (ii) una columna de HIC cuya fase estacionaria comprende grupos hidrófobos seleccionados entre el grupo que consiste en grupos alquilo, grupos arilo, y una combinación de los mismos; o
- (iii) una resina de agarosa sustituida con grupos fenilo.
4. El método de la reivindicación 1 que comprende además una etapa de filtración, en el que dicha muestra de HIC se somete a filtración para retirar partículas virales y para facilitar el intercambio de tampón.
5. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha muestra de pH reducido en la etapa (c) tiene un pH de aproximadamente 3,5.

Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de cultivo celular

| Etapa de cultivo celular | Punto de ajuste/diana | Ensayo de controles en el proceso | Límite de acción |
|---|---|--|--|
| Banco celular maestro | Temp. de almacenamiento ≤ -130 °C | Viabilidad en la descongelación | ≥ 80 % |
| ↓ | | | |
| 1 x Matraz para rotor desechable de 125 ml | Temperatura 37 °C CO ₂ al 5 % | Viabilidad del cultivo en la transferencia | ≥ 80 % |
| ↓ | | | |
| 1 x Matraz para rotor desechable de 125 ml | Temperatura 37 °C CO ₂ al 5 % | Viabilidad del cultivo en la transferencia | ≥ 80 % |
| ↓ | | | |
| 3 x Matraces para rotor desechable de 125 ml | Temperatura 37 °C CO ₂ al 5 % | Viabilidad del cultivo en la transferencia | ≥ 80 % |
| ↓ | | | |
| 1 x Bolsa Biowave de 2 l | Temperatura 37 °C CO ₂ al 5 % | Viabilidad del cultivo en la transferencia | ≥ 80 % |
| ↓ | | | |
| 1 x Bolsa Biowave de 20 l | Temperatura 37 °C CO ₂ al 5 % | Viabilidad del cultivo en la transferencia | ≥ 80 % |
| ↓ | | | |
| 2 x Bolsas Biowave de 20 l | Temperatura 37 °C CO ₂ al 5 % Viabilidad del cultivo en la transferencia | Viabilidad del cultivo en la transferencia Recuento de células viables en la transferencia comprobación de contaminación | ≥ 80 % $\geq 2,0 \times 10^6$ /ml Sin crecimiento |
| ↓ | | | |

Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de cultivo celular (continuación)

| Etapa de cultivo celular | Punto de ajuste/diana | Ensayo de controles en el proceso | Límite de acción |
|---|--|---|--|
| <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Biorreactor de semilla de 110 l </div> <p style="text-align: center;">↓</p> | Temperatura 37 °C pH 7,1 DO 40 % | Recuento de células viables en la transferencia Comprobación de contaminación | $\geq 2,6 \times 10^6/\text{ml}$ Sin crecimiento |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Biorreactor de producción de 3000 l (llenado parcial) </div> <p style="text-align: center;">↓</p> | Temperatura 37 °C pH 7,1 DO 40 % | Recuento de células viables al final del llenado parcial | $\geq 1,6 \times 10^6/\text{ml}$ |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Biorreactor de producción de 3000 l </div> | Temperatura 35 → 33 °C pH 6,9 DO 40% | Recuento de células viables en el cambio de temperatura <i>Muestras diarias:</i> Recuento de células diario Concentración de glucosa HPLC Poros A (título de ABT-308) <i>Muestra recogida (global sin procesar):</i> Viabilidad de recogida HPLC Poros A (título de ABT-308) Endotoxinas TEM Mycoplasma Virus casuales Q-PCR para MVM Comprobación de contaminación | $\geq 3,0 \times 10^6/\text{ml}$ Valor informado Valor informado Valor informado $\leq 50\%$ Valor informado $\leq 5 \text{ EU/ml}$ $\leq 10^8$ partículas tipo viral/ml Negativo ^a Sin evidencia de contaminación viral ^a Negativo ^a Sin crecimiento ^a |

Figura 3. Comparación de estrategias de flujo de proceso de cultivo celular alternativas

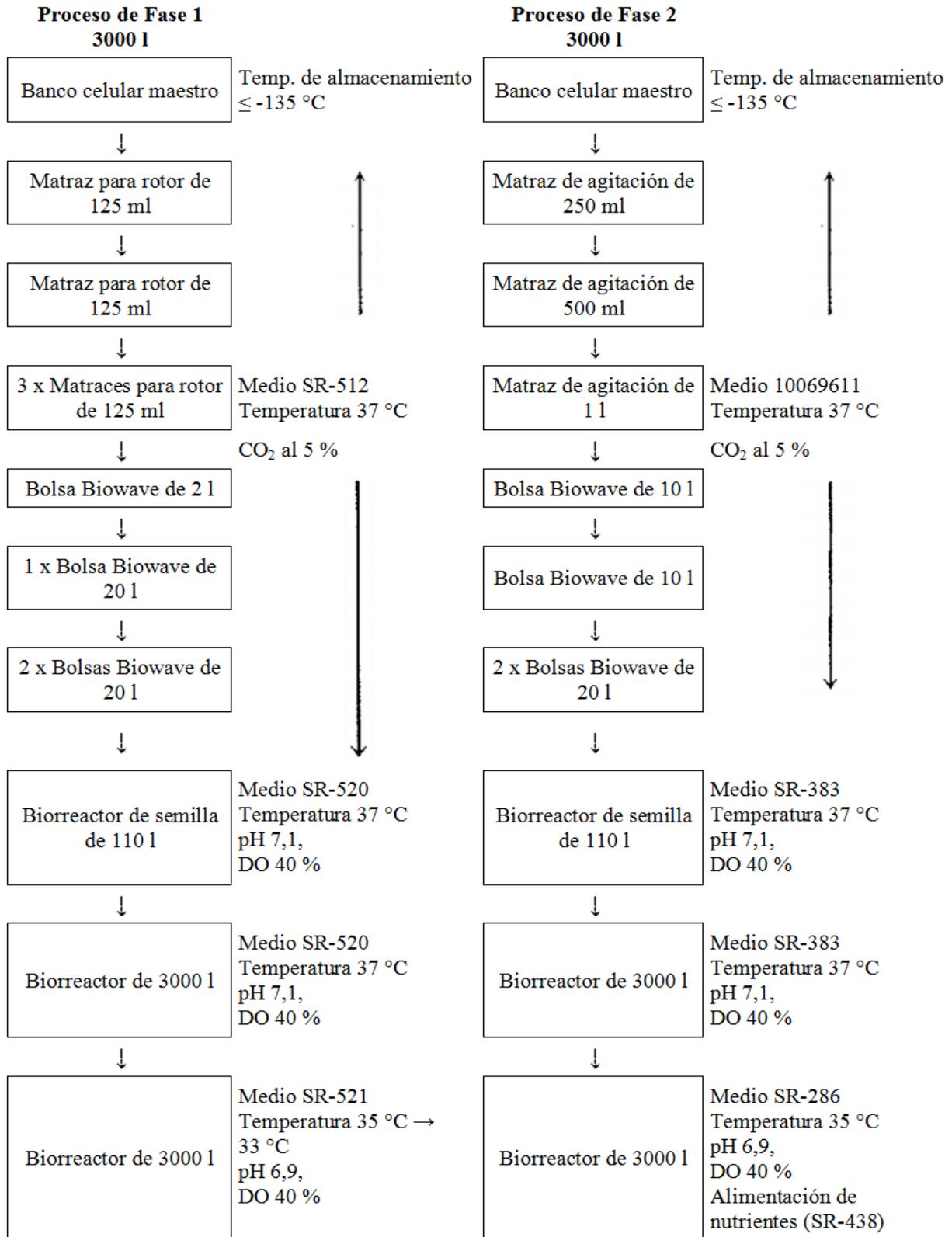


Figura 4. Diagrama de flujo del proceso de recuperación primaria y cromatografía de captura

| Etapa | Punto de ajuste/diana | Ensayo de controles en el proceso | Límite de acción |
|--|---|---|--|
| Clarificado de recuperación primaria y recogida | Temperatura ambiente 10-25 l/min Filtros de lecho profundo y membrana | HPLC Poros A Carga biológica ^a Endotoxinas ^a | Registrado para calcular la masa ≤ 15,0 CFU/ml ≤ 5 EU/ml |
| ↓ | | | |
| Cromatografía de afinidad a Proteína A | Temperatura ambiente Columna de 45 x 22 cm (35 l) Caudal 150-300 cm/h Tampón de elución a pH 3,5 Carga ≤ 32 g de proteína/l de resina Mantener eluato a ambiente | A ₂₈₀ SE-HPLC Carga biológica ^a Endotoxinas ^a | Registrado para calcular la masa ≥ 90,0 % Monómero ≤ 15,0 CFU/ml ≤ 5 EU/ml |
| ↓ | | | |
| Tratamiento a pH bajo y filtración | Temperatura ambiente pH 3,5, 60-70 min Ajustar a pH 5 Filtros de lecho profundo y membrana | A ₂₈₀ SE-HPLC Carga biológica ^a Endotoxinas ^a | Registrado para calcular la masa ≥ 90,0 % Monómero ≤ 15,0 CFU/ml ≤ 5 EU/ml |
| ↓ | | | |

a. Muestra tomada al principio de la siguiente operación unitaria.

Figura 5. Comparación de estrategias de flujo de recuperación primaria y captura alternativas

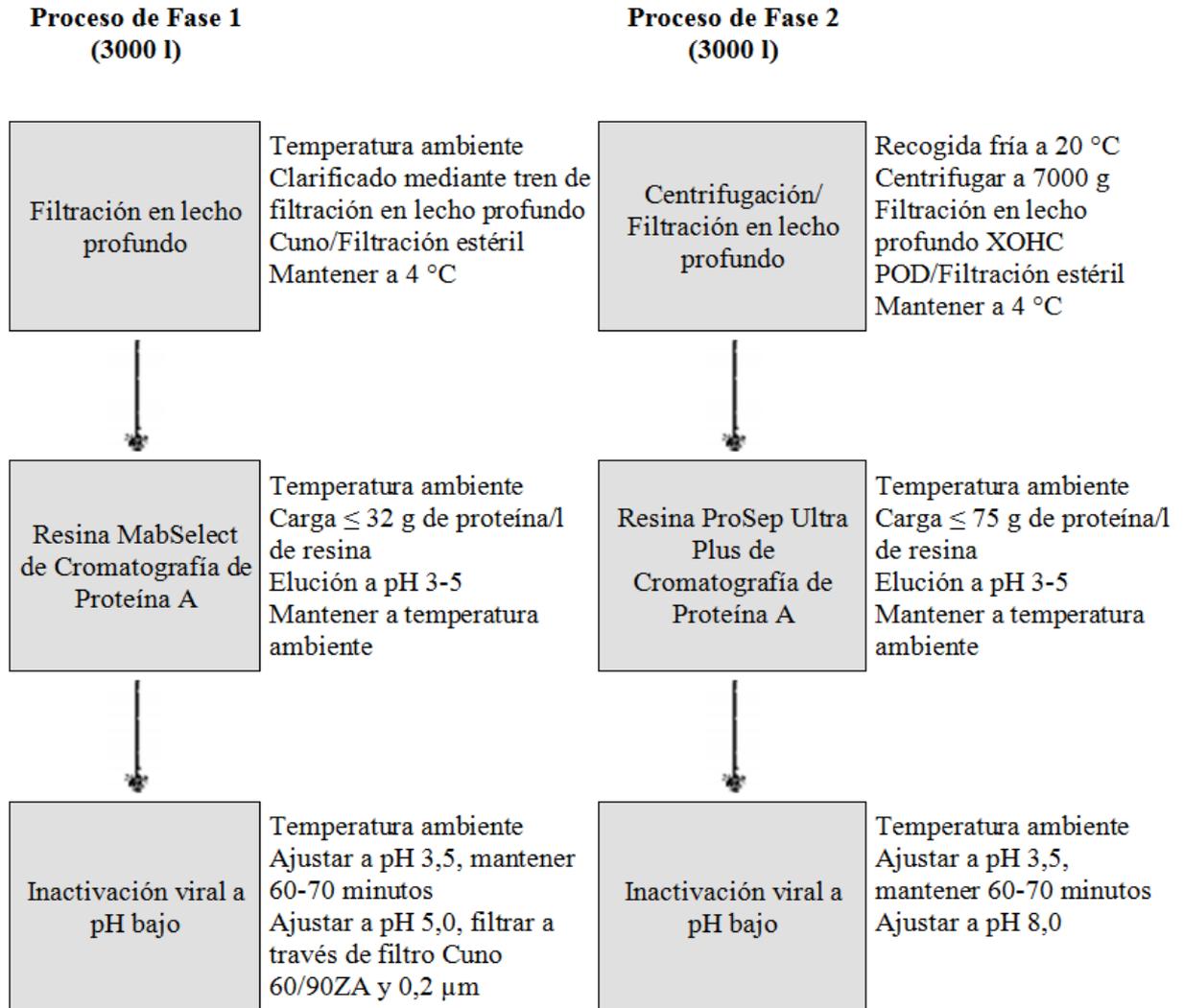


Figura 6. Diagrama de flujo del proceso de purificación fina

| Etapa | Punto de ajuste/diana | Ensayo de controles en el proceso | Límite de acción |
|---|--|--|--|
| Cromatografía de intercambio aniónico fuerte | Temperatura 10-14 °C Ajustar a pH 8 Ajustar conductividad a 5,0-6,5 mS/cm Filtros Delipid y de membrana columna de 45 x 22 cm (35 l) Caudal de 100 cm/h Carga ≤ 80 g de proteína/l de resina | Carga A ₂₈₀ SE-HPLC Carga biológica ^a Endotoxinas ^a | Registrado para calcular la masa ≥ 90,0 % Monómero ≤ 15,0 CFU/ml ≤ 5 EU/ml |
| ↓ | | | |
| Cromatografía de interacción hidrófoba | Temperatura 10-14 °C Columna de 60 x 15 cm (42 l) pH 7 Caudal de 20-75 cm/h Carga ≤ 64 g de proteína/l de resina | Carga A ₂₈₀ Eluato A ₂₈₀ SE-HPLC Carga biológica ^a Endotoxinas ^a | Registrado para calcular la masa Registrado para calcular la masa ≥ 90,0 % Monómero ≤ 15,0 CFU/ml ≤ 5 EU/ml |
| ↓ | | | |
| Nanofiltración | Temperatura 10-14 °C Presión ≤ 34 g psig | Filtrado A ₂₈₀ SE-HPLC Carga biológica ^a Endotoxinas ^a Integridad del filtro | Registrado para calcular la masa ≥ 90,0 % Monómero ≤ 15,0 CFU/ml ≤ 5 EU/ml ≥ 32,8 ml/min a 85 psig (UDV20) ≥ 17,0 ml/min a 85 psig (DV20) |
| ↓ | | | |

a. Muestra tomada al principio de la siguiente operación unitaria.

Figura 6. Diagrama de flujo del proceso de purificación fina (continuación)

| Etapa | Punto de ajuste/diana | Ensayo de controles en el proceso | Límite de acción |
|---|---------------------------------------|--|----------------------------------|
| UF/DF | Temperatura 10-14 °C | A_{280} | Registrado para calcular la masa |
| | Diafiltrar en histidina 15 mM, pH 5,6 | SE-HPLC | $\geq 90,0$ % Monómero |
| | Concentración diana 120-160 g/l | Carga biológica ^a | $\leq 15,0$ CFU/ml |
| | | Endotoxinas ^a | ≤ 5 EU/ml |
| ↓ | | | |
| Filtrar, embotellar y congelar sustancia farmacológica | Temperatura 2-8 °C | A_{280} | Registrado para calcular la masa |
| | Congelar a -80 °C (nominal) | Carga biológica | ≤ 1 CFU/ml ^c |
| | Concentración diana 120-160 g/l | Endotoxinas ^b | $\leq 0,2$ EU/mg ^c |
| | | Integridad del filtro ^b | Punto de burbujeo ≥ 50 psid |

a. Muestra tomada al principio de la siguiente operación unitaria.

b. Resultados del ensayo de la sustancia farmacológica.

c. Especificaciones de la sustancia farmacológica.

Figura 7. Comparación de estrategias de flujo de purificación fina alternativas

