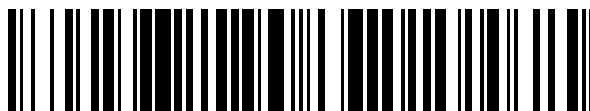


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 639**

51 Int. Cl.:
C07K 14/715 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10184728 .3**
96 Fecha de presentación: **01.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **2267024**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2010**

54 Título: **Producción de una proteína de unión a IL-18 recombinante**

30 Prioridad:
03.06.2005 US 687631 P
03.06.2005 EP 05104878
13.07.2005 EP 05106429

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.07.2012

73 Titular/es:
ARES TRADING S.A.
Zone Industrielle de l'Ouriettaz
1170 Aubonne, CH

72 Inventor/es:
Wieber, Urs y
Ziegler, Thierry

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 385 639 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

Producción de una proteína de unión a IL-18 recombinante.

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la producción de proteínas. De modo más específico, se refiere a un proceso para la producción de una proteína de unión a IL-18 recombinante (IL-18BP). La invención se refiere además a una composición de IL-18BP que se caracteriza por un perfil de glicosilación específico.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas se han vuelto importantes desde el punto de vista comercial como fármacos que también se denominan en general "biológicos". Uno de los mayores retos es el desarrollo de procesos eficaces y rentables para la producción de proteínas recombinantes a escala comercial.

La industria de la biotecnología utiliza con profusión células de mamífero para la fabricación de glicoproteínas recombinantes para la terapia humana.

15 En la actualidad, los cultivos semicontinuos y de perfusión son los dos modos dominantes de funcionamiento industrial para los procesos de cultivo de células de mamífero que requieren grandes cantidades de proteínas (Hu y Aunins, 1997). Cualquiera que sea la elección de la tecnología de producción, los intentos de desarrollo se dirigen a la obtención de procesos de producción que garanticen una alta productividad volumétrica, una coherencia entre los lotes, y una calidad homogénea del producto a bajo coste.

20 La decisión entre el modo de producción semicontinuo o de perfusión viene dictada principalmente por la biología del clon y por la propiedad del producto, y se realiza basándose en cada caso durante el transcurso del desarrollo de un nuevo producto de fármaco (Kadouri y Spier, 1997).

Cuando se selecciona el proceso de perfusión, uno de los sistemas de cultivo que puede elegirse es un biorreactor de lecho cargado estacionario, en el que las células se inmovilizan sobre vehículos sólidos. Este sistema es fácil de manejar y puede lograrse una densidad celular muy alta (aproximadamente 10^7 - 10^8 células.ml⁻¹) con los vehículos y las condiciones de cultivo apropiadas.

25 Una consecuencia de esta alta densidad celular es la necesidad de una velocidad de perfusión del medio intensiva (alimentación y recolección), que debe utilizarse para mantener a las células viables y productivas. Parece que la velocidad de perfusión es uno de los parámetros fundamentales para dicho proceso: conduce la productividad de proteínas volumétrica, la calidad del producto de proteínas, y tiene un impacto muy fuerte sobre el coste económico global del proceso.

30 Por tanto, a escala industrial, el proceso del biorreactor de lecho cargado estacionario óptimo debería funcionar con una velocidad de perfusión lo más baja posible sin comprometer la cantidad y la calidad del producto.

35 En el transcurso de la reducción de la velocidad de perfusión se han realizado varios estudios en los que se empleó la concentración de la glucosa (Wang et al., 2002) (Dowd et al., 2001) como indicador del nivel de otros nutrientes en el medio de alimentación para hacer funcionar el biorreactor a una velocidad de perfusión baja sin acumular en el cultivo altos niveles de subproductos tóxicos, tales como lactato y amoniaco (Sugiura y Kakuzaki, 1998) (Racher et al., 1993). La modificación de los parámetros del cultivo, tales como pH y temperatura (Chuppa et al., 1997) también es una estrategia habitual para optimizar las condiciones del cultivo y reducir las necesidades de perfusión del medio.

Para lograr una velocidad de perfusión óptima pueden considerarse tres estrategias:

40 a) Fijar la velocidad de perfusión a un valor constante durante la totalidad de la ejecución de la producción. Esta estrategia normalmente se prefiere en procesos de producción industrial, puesto que es más sencillo su funcionamiento de una manera robusta y constante. También tiene la ventaja de definir un coste medio del proceso porque no hay variación en la velocidad de perfusión de una ejecución a otra.

45 b) Ajustar la velocidad de perfusión en respuesta al número de células y/o al consumo de nutrientes, tales como glucosa (Oh et al., 1994) (Dowd et al., 2001) (Gorenflo et al., 2003), glutamina (Gorenflo et al., 2002) u oxígeno (Kyung et al., 1994). Aunque esta estrategia proporciona un fundamento más científico para ajustar la velocidad de perfusión, puede conducir un sobrecrecimiento del cultivo y a un aumento "fuera de control" de la velocidad de perfusión. Cuando las células se cultivan en el modo de suspensión se realiza un "sangrado del cultivo" para evitar el sobrecrecimiento del cultivo, pero esto no es posible cuando las células están inmovilizadas sobre un vehículo. Por tanto, en general esta estrategia no se prefiere para operaciones de fabricación, porque es difícil de ejecutar de una manera robusta y constante, y la velocidad de perfusión del medio debe reajustarse a diario.

50 c) Combinar ambas estrategias a) y b) con una fase de propagación celular inicial (o "fase de crecimiento"), en la

que la velocidad de perfusión aumenta de modo progresivo según las necesidades de crecimiento de las células durante la fase de crecimiento, seguido de un desplazamiento de las condiciones de cultivo, tales como la temperatura y/o el pH, para estabilizar y mantener el metabolismo celular a un nivel relativamente bajo y constante. En esta etapa, la velocidad de perfusión puede reducirse hasta un valor fijo, que se corresponde con las menores necesidades de las células a lo largo de la fase de producción.

Se sabe que la modificación de la velocidad de perfusión durante un proceso de perfusión, así como la modificación de otros factores del bioproceso, puede influir en la calidad de la proteína recombinante y, en particular, en su patrón de glicosilación (Jenkins et al., 1996) (Andersen et al., 2000). La glicosilación habitualmente se reconoce como una función importante para la solubilidad, la inmunogenicidad, y las propiedades farmacocinéticas de las glicoproteínas humanas, y éstas son parámetros clave en la seguridad y la eficacia clínica de un producto (Goochee et al., 1991). En particular, la glicosilación afecta al plegamiento y a la secreción de muchas glicoproteínas, así como a su semivida plasmática, teniendo por tanto un impacto importante en la biología y la actividad *in vivo* de las proteínas glicosiladas.

En general, el término "glicosilación" de una proteína se refiere a la formación de un enlace azúcar-aminoácido. La glicosilación es un acontecimiento crucial en la biosíntesis de las unidades carbohidrato de las glicoproteínas (segregadas). Pone en marcha una serie compleja de etapas enzimáticas postraduccionales que conducen a la formación de una multitud de oligosacáridos unidos a proteínas con diversas funciones biológicas.

Las glicoproteínas de mamífero normalmente contienen tres tipos de glicanos constituyentes: los glicanos *N*-enlazados, que se unen a la asparagina a través de un resto *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) en un motivo Asn-Xxx-(Ser, Thr), en el que Xxx puede ser cualquier aminoácido excepto prolina; los que están unidos a serina o treonina, denominados glicanos *O*-enlazados; y los componentes de carbohidrato del glicosilfosfatidilinositol. Aunque son posibles muchas variaciones, las antenas de los glicanos maduros consisten habitualmente en una o más unidades de *N*-acetil-lactosamina, terminando las cadenas en ácido siálico o en galactosa α -enlazada. Con frecuencia se encuentra a la fucosa unida al resto GlcNAc unido a asparagina, y a menudo también en las antenas. Otras modificaciones habituales en la estructura básica incluyen un resto GlcNAc unido en la posición 4 del resto manosa ramificado de la parte central, denominado resto GlcNAc "biseccante", y grupos sulfato que pueden estar en una diversidad de localizaciones, en la parte central y en las antenas.

La biosíntesis de estos compuestos implica la unión de la asparagina a un glicano que contenga la parte central de trimanosilquitobiosa, junto con seis restos manosa y tres restos glucosa adicionales, seguido de la eliminación de la glucosa y de los cuatro restos manosa. Entonces diversas otras glicosil transferasas y glicosidasas procesan la estructura de (GlcNAc)₂(Man)₅ para producir el glicano maduro. Este proceso produce tres tipos generales de glicanos *N*-enlazados dependiendo del grado de procesamiento: glicanos "con alto contenido en manosa", en los que sólo hay restos manosa en las dos antenas; "glicanos híbridos", en los que una antena se procesa; y glicanos "complejos", en que se modifican ambas antenas. Los glicanos *O*-enlazados, por otra parte, son mucho más diversos, y varían de monosacáridos a grandes polisacáridos sulfatados sin una estructura central ni secuencia consenso de aminoácidos comunes en el sitio de unión (Harvey, 2001).

Una de estas proteínas glicosiladas de interés terapéutico es la proteína de unión a interleuquina-18.

La proteína de unión a la interleuquina-18 (IL-18BP) es una proteína natural soluble que se purificó por primera vez por afinidad en una columna de IL-18 a partir de la orina (Novick et al., 1999). La IL-18BP suprime la inducción por IL-18 de IFN- γ y la activación por IL-18 de NF- κ B *in vitro*. Además, la IL-18BP inhibe la inducción de IFN- γ en ratones inyectados con LPS.

El gen de IL-18BP se localizó sobre el cromosoma 11 humano, y no se han encontrado exones que codifiquen un dominio transmembrana en la secuencia genómica de 8,3 kb que comprende el gen de IL-18BP. Hasta la fecha, en los seres humanos se han identificado cuatro isoformas de la IL-18BP generadas por un corte y empalme alternativo del ARNm. Se han denominado IL-18BP a, b, c y d, y todas comparten el mismo N-terminal y se diferencian en el C-terminal (Novick et al., 1999). Estas isoformas varían en su capacidad para unirse a IL-18 (Kim et al., 2000). De las cuatro isoformas de la IL-18BP humana (hIL-18BP), se sabe que las isoformas a y c tienen una capacidad neutralizante de la IL-18. La isoforma de IL-18BP más abundante, la isoforma a, muestra una alta afinidad por IL-18 con una constante de afinidad ("on-rate") rápida y de disociación ("off-rate") lenta, y una constante de disociación (Kd) de aproximadamente 0,4 nM (Kim et al., 2000).

La IL-18BP pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas.

Los restos implicados en la interacción de IL-18 con IL-18BP se han descrito mediante el uso de modelos informáticos (Kim et al., 2000) y se basan en la interacción entre la proteína similar IL-1 β con IL-1R de tipo I (Vigers et al., 1997).

La IL-18BP está presente constitutivamente en muchas células (Puren et al., 1999) y circula en seres humanos sanos, representando un fenómeno exclusivo en la biología de las citoquinas. Debido a la alta afinidad de la IL-18BP por la IL-18 (Kd = 0,4 nM), así como la alta concentración de IL-18BP que se encuentra en la circulación (un exceso

molar en 20 veces frente a IL-18), se ha especulado que la mayoría, sino todas, de las moléculas de IL-18 en la circulación están unidas a IL-18BP. Por tanto, la IL-18BP circulante que compite con los receptores para IL-18 de la superficie celular puede actuar como un antiinflamatorio natural y como molécula inmunosupresora.

5 Se ha sugerido la IL-18BP como proteína terapéutica en una serie de enfermedades y trastornos, tales como la psoriasis, la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide, la artritis psoriática, los daños hepáticos, la sepsis, la aterosclerosis, las enfermedades cardíacas isquémicas, las alergias, etc; véanse, por ejemplo, los documentos WO9909063, WO0107480, WO0162285, W00185201, WO02060479, WO02096456, WO03080104, WO02092008, WO02101049, WO03013577.

10 La técnica anterior no describe un proceso para la producción de IL-18BP recombinante en células CHO, ni composiciones de IL-18BP caracterizadas por un perfil de glicosilación específico.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al desarrollo de un proceso para producir una proteína de unión a interleuquina-18 (IL-18BP) recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO) en un biorreactor en condiciones de cultivo sin suero, que comprende una fase de propagación celular a 37,5 °C y una fase de producción a 29°C.

15 Se ha desarrollado un proceso discontinuo eficaz para la producción de IL-18BP en células CHO en condiciones de cultivo sin suero comprende:

- a) una fase de propagación celular a 37 °C;
- b) opcionalmente, una fase intermedia a 33 °C;
- c) una fase de producción a 29 °C.

20 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Velocidad de perfusión del medio durante cultivos continuos de células CHO en un biorreactor de lecho cargado según el ejemplo 1, con unos niveles de perfusión de 2,6 vvd (●), 2,0 vvd (O), y 1,3 vvd (▲). Las ejecuciones del biorreactor se han marcado como **ejecución-100** para 100% de perfusión (●), **ejecución-75** para 75% de perfusión (O), y **ejecución-50** para 50% de perfusión (▲). La velocidad de perfusión máxima de 100% se corresponde con 2,6 vvd que fue utilizada como condición de referencia.

Figura 2: Perfiles de concentración de glucosa (A) y lactato (B) durante cultivos continuos de células CHO en un biorreactor de lecho cargado según el ejemplo 1, con unas velocidades de perfusión del medio de 100% (●), 75% (O) y 50% (▲).

30 Figura 3: Perfil de velocidad de consumo de glucosa (GCR) durante cultivos continuos de células CHO en un biorreactor de lecho cargado según el ejemplo 1, con unas velocidades de perfusión del medio de 100% (●), 75% (O) y 50% (▲). La GCR se expresa en gramos de glucosa consumidos por día y por kg de vehículo Fibra-Cel.

Figura 4: Perfil de la proporción de conversión molar de lactato desde glucosa aparente durante cultivos continuos de células CHO en un biorreactor de lecho cargado según el ejemplo 1, con unas velocidades de perfusión del medio de 100% (●), 75% (O) y 50% (▲).

35 Figura 5: Datos de productividad normalizados, (A) productividad volumétrica en unidades de producto por volumen total del cultivo por día, (B) producto acumulado en unidades de producto, (C) valoración en unidades de producto por volumen total del cultivo, para r-IL-18BP que se produce durante cultivos continuos de células CHO en un biorreactor de lecho cargado según el ejemplo 1, con unas velocidades de perfusión del medio de 100% (●), 75% (O) y 50% (▲). Para normalizar los datos, el valor medio obtenido con una velocidad de perfusión de 100% a lo largo de la fase de producción de 60 días se consideró 100% de la productividad (línea de puntos).

Figura 6: Sialilación mediante cartografiado de N-glicanos (perfiles de RP-HPLC) en muestras de la masa intermedias en el día de producción 47-48 en la ejecución-50, ejecución-75 y ejecución-100.

Figura 7: Actuación del proceso de semicontinuo según el ejemplo 2 en términos de (A) la densidad celular total, (B) la viabilidad, (C) la concentración de glucosa residual, y (D) la valoración de r-hIL-18BP.

45 Figura 8: Sialilación mediante cartografiado de N-glicanos (perfiles de RP-HPLC) en IL-18BP purificada preparada en un proceso de perfusión (panel superior) o en un proceso semicontinuo (panel inferior).

Figura 9: Comparación de los perfiles de electroforesis capilar de zonas (CZE) obtenidos a partir de dos secuencias analíticas distintas, para una muestra recolectada bruta (pretratada) del proceso semicontinuo (superior), y una muestra recolectada (pretratada) del proceso de perfusión (inferior).

50 Figura 10: Distribución de las isoformas (indicadas como porcentaje de todas las formas de la molécula diana)

mediante una electroforesis capilar de zonas (CZE) en muestras recolectadas brutas pretratadas (punteadas y grises) y muestras purificadas (rayadas y negras) de IL-18BP para ejecuciones con perfusión (punteadas y rayadas) y ejecuciones semicontinuas (grises y negras). Las barras de error se corresponden con la variabilidad $\pm 10\%$ del método de CZE.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el desarrollo de procesos eficaces para la producción de IL-18BP recombinante en un biorreactor en condiciones de cultivo celular sin suero. Por tanto, la presente invención se refiere a un proceso para producir una proteína de unión a interleuquina-18 (IL-18BP) recombinante en células CHO en un biorreactor en condiciones de cultivo sin suero, que comprende una fase de propagación celular a 37 °C y una fase de producción a 29 °C.

Cualquier temperatura entre aproximadamente 29 °C a aproximadamente 34 °C será adecuada en el marco de la presente descripción, tal como, por ejemplo, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 30,5, 31, 31,5, 32, 32,5, 33, 33,5, 34, 34,5, 35 °C.

Se describe un proceso de perfusión para producir una proteína de unión a interleuquina-18 (IL-18BP) recombinante en células de mamífero en un biorreactor en condiciones de cultivo sin suero, que comprende:

- a) una fase de propagación celular a 37 °C con una velocidad de perfusión dada (100%);
- b) una fase de producción I a 33,5 °C con una velocidad de perfusión que varía de aproximadamente 85% a aproximadamente 65%, o de aproximadamente 80% a aproximadamente 70% o aproximadamente 75% de la velocidad de perfusión de la etapa a);
- c) una fase de producción II a 32,5 °C con una velocidad de perfusión que varía de aproximadamente 85% a aproximadamente 65%, o de aproximadamente 80% a aproximadamente 70% o aproximadamente 75% de la velocidad de perfusión de la etapa a).

Los expertos en la técnica apreciarán que la velocidad de perfusión de la fase de producción (I, II o ambas) puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66 ó 65% de la velocidad de perfusión inicial en la etapa a).

Tal como se muestra en los ejemplos que aparecen a continuación, se ha descubierto de modo sorprendente que, a pesar de la velocidad de perfusión reducida, la productividad celular de la IL-18BP se conservó sustancialmente.

Los expertos en la técnica también apreciarán que la temperatura puede variar dentro de ciertos límites, de forma que puede ser, por ejemplo, aproximadamente 37,5 °C en la etapa (a), o 34-33 °C en la etapa (b), o 32-33 °C en la etapa (c).

Generalmente, la concentración de oxígeno disuelto (DO) de un cultivo celular se mantiene de aproximadamente 50% al 70% de saturación de aire, y los valores de pH varían entre 6,5 y 7,5, preferiblemente aproximadamente 7,0.

El término "biorreactor", tal como se emplea en la presente, se refiere a un aparato o recipiente cerrado que se utiliza para generar biomoléculas, tales como proteínas segregadas, empleando la capacidad de conversión química o sintética de una célula. Los biorreactores incluyen los fermentadores y los sistemas de perfusión de cultivos celulares clásicos. Los biorreactores permiten controlar diversos parámetros durante el proceso del cultivo celular tales como, por ejemplo, el bucle de flujo de circulación, la temperatura, la sobrepresión y/o la velocidad de perfusión del medio.

La expresión "medio sin suero", tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier medio que no tenga componentes derivados de suero animal tales como, por ejemplo, suero de ternera fetal. Los ejemplos de medios sin suero disponibles en el mercado que pueden utilizarse según la presente invención incluyen, por ejemplo, SFM 90 (JRH, 67350), SFM 90.1 (JRH, 67350), Supmed300 o Supmed300 modificado (JRH, 67350), DMEM (Gibco, 7490571), DMEM/F12 (Gibco, 99.5043), SFM CHO 3a (BioWhittaker), CHO PFM (Sigma, C6970), ProCHO 5, medios EX-CELL, tales como EX-CELL 302 (JRH, nº de catálogo 14312-1000M) o EX-CELL 325 (JRH, nº de catálogo 14335-1000M), CHO-CD3 (Sigma, nº de catálogo C-1490), CHO III PFM (Gibco, nº de catálogo 96-0334SA), CHO-S-SFM II (Gibco, nº de catálogo 12052-098), CHO-DHFR (Sigma, nº de catálogo C-8862), ProCHO 5 (Cambrex, nº de catálogo BE12-766Q), SFM4CHO (HyClone, nº de catálogo SH30549.01), Ultra CHO (Cambrex, nº de catálogo 12-724Q), HyQ PF CHO (HyClone, nº de catálogo SH30220.01), HyQ SFX CHO (HyClone, nº de catálogo SH30187.01), HyQ CDM4CHO (HyClone, nº de catálogo SH30558.01), IS CHO-CD (Irvine Scientific, nº de catálogo 91119), IS CHO-V (Irvine Scientific, nº de catálogo 9197) y sus derivados. La composición de SFM 90, SFM 90.1, SupMed300, DMEM, DMEM/F12, SFM CHO 3^a y CHP PFM se muestra en la tabla 1 que aparece a continuación.

El medio sin suero puede ser preferiblemente un medio químicamente definido, es decir, un medio preparado a partir de ingredientes purificados y, por tanto, cuya composición exacta se conoce. De modo específico, los medios químicamente definidos no contienen componentes derivados de animales ni hidrolizados no definidos.

Según el proceso de perfusión, en una realización preferida, la velocidad de perfusión de la etapa a) tiene una velocidad de dilución en el intervalo de aproximadamente 2 a 3 vvd, preferiblemente de aproximadamente 2,5 vvd.

5 La expresión "velocidad de dilución", según se define en la presente, se refiere a la velocidad de dilución D expresada en vvd, calculada como litro de medio por litro de volumen de trabajo del sistema total por día (volumen total = lecho cargado + volumen del tanque de acondicionamiento).

Los expertos en la técnica apreciarán que la velocidad de perfusión de la etapa a) puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0 ó 3,1 vvd.

Unas velocidades de perfusión iniciales de aproximadamente 2,6 ó 2,5 ó 2,75 vvd han demostrado ser particularmente ventajosas.

10 La longitud de la fase de propagación celular de la etapa a), la fase de producción I de la etapa b), y la fase de producción II de la etapa c) puede ser determinada con facilidad por los expertos en la técnica basándose en parámetros, tales como la siembra celular inicial, el tipo de células utilizadas, la velocidad de consumo de glucosa medida a diario, la velocidad de dilución, y el tiempo del proceso. Según la presente invención, se prefiere que las células se asocien a vehículos en el biorreactor, y que la fase de producción I de la etapa b) comience a una
15 velocidad de consumo de glucosa de aproximadamente 250 a 350 g de glucosa por kilogramo de vehículo.

El vehículo que puede utilizarse según los procesos de la presente invención puede ser, por ejemplo, un microvehículo. Los microvehículos son partículas sólidas pequeñas sobre las cuales pueden crecer células en un cultivo en suspensión. Las células son capaces de adherirse y propagarse sobre la superficie de los microvehículos. Generalmente, los microvehículos consisten en esferas, cuyo diámetro está comprendido entre 90 µm y 300 µm. Los
20 microvehículos pueden estar fabricados de diversos materiales que han demostrado ser adecuados para la adhesión y la propagación de células tales como, por ejemplo, vidrio, poliestireno, polietileno, dextrano, gelatina y celulosa. Además, la superficie de los microvehículos puede revestirse con un material que estimule la adhesión y el crecimiento de las células tales como, por ejemplo, N,N-dietilaminoetilo, vidrio, colágeno, o proteínas recombinantes. Existen microvehículos macroporosos y no porosos. Las superficies macroporosas ofrecen a las células un acceso
25 fácil al interior del microvehículo después de la inoculación, y cuando ya están dentro del microvehículo, las células están protegidas frente a las fuerzas de cizallamiento generadas por la agitación mecánica y la aireación en el biorreactor.

Otro vehículo sólido que puede utilizarse según la presente invención puede ser, por ejemplo, un disco Fibra-Cel®. Los discos Fibra-Cel® son discos con un diámetro de 6 mm que están compuestos de fibra no tejida de poliéster unida a una lámina de malla de polipropileno (véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.266.476 y las páginas de la red nbsc.com/products/miscellaneous/fibracel/ y nbsc.com/support/faqs/#fibra). Los discos Fibra-Cel® habitualmente se tratan de modo electrostático para que sea más fácil que las células en suspensión se adhieran a los discos y queden atrapadas en el sistema de fibras, en donde permanecen a lo largo del proceso de cultivo. La densidad celular y la productividad logradas con células cultivadas en discos Fibra-Cel® puede ser hasta diez veces
30 mayor que con células cultivadas sobre microvehículos.

Las células que expresan IL-18BP, que pueden cultivarse en el biorreactor según los procesos descritos en la presente, pueden ser cualquier célula de mamífero, incluyendo células animales o humanas tales como, por ejemplo, células 3T3, células COS, células de osteosarcoma humano, células MRC-5, células BHK, células VERO, células CHO, células rCHO-tPA, células rCHO-antígeno de la superficie de Hep B, células CHO-S, células HEK 293, células rHEK 293, células rC127-antígeno de la superficie de Hep B, células de fibroblastos humanos normales, células estromáticas, células de hepatocitos, y células PER.C6.

Se emplean células de ovario de hámster chino (CHO) para la expresión de IL-18BP en un proceso según la invención.

45 Los procesos para la producción de IL-18BP de la invención preferiblemente comprenden además una etapa de recolectar el sobrenadante del cultivo celular (recolección).

En otra realización preferida, el proceso comprende además una o más etapas de purificación de la IL-18BP. Puede utilizarse cualquier método adecuado para la purificación de la IL-18BP tal como, por ejemplo, los procesos de purificación descritos para la IL-18BP en los documentos WO 2006/003134 o WO 2005/049649.

El producto de IL-18BP purificada preferiblemente entonces puede formularse en una composición farmacéutica.

50 La descripción también se refiere a una composición de IL-18BP que se caracteriza por un perfil de sialilación que comprende de aproximadamente 15% a aproximadamente 25%, preferiblemente de aproximadamente 19% a aproximadamente 21% de N-glicanos no sialilados, de aproximadamente 15% a aproximadamente 30%, preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 25% de glicanos monosialilados, de aproximadamente 35% a aproximadamente 55%, preferiblemente de aproximadamente 39% a aproximadamente
55 44% de N-glicanos disialilados, de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, preferiblemente de

aproximadamente 7% a aproximadamente 10% de N-glicanos trisialilados, y de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 3% de N-glicanos tetrasialilados.

Dicha composición de IL-18BP se obtiene preferiblemente mediante los procesos de producción de la invención.

5 La presente invención se refiere a un proceso semicontinuo para producir la proteína de unión a interleuquina-18 (IL-18BP) recombinante en células CHO en un biorreactor en condiciones de cultivo sin suero, que comprende las etapas de:

- a. una fase de propagación celular a 37 °C;
- b. opcionalmente, una fase intermedia a 33 °C;

10 c. una fase de producción a 29 °C.

Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad la longitud de las fases (a), opcionalmente (b), y (c). La fase (a) continuará hasta que se haya generado un número adecuado de células tal como, por ejemplo, en el intervalo de 10^5 a 10^6 . La fase (b) preferiblemente será corta, puesto que es una fase transitoria que actúa para adaptar a las células a unas temperaturas más bajas.

15 En una realización preferida, la densidad celular total en la fase de producción varía entre 4 a 8×10^6 células por ml por día, preferiblemente a lo largo de al menos 10 días de cultivo celular.

En otra realización preferida, la viabilidad varía entre 100% y 80%, preferiblemente a lo largo de al menos 10 días de cultivo celular.

20 También se prefiere que la productividad de proteínas sea mayor que aproximadamente 150 mg o aproximadamente 250 mg o aproximadamente 350 mg por l por día.

Las células de mamífero para utilizarse en el marco del proceso de la presente invención son las células de ovario de hámster chino (CHO).

El proceso preferiblemente comprende además las etapas de recolectar el sobrenadante del cultivo celular y/o purificar la IL-18BP y/o formular la IL-18BP en una composición farmacéutica.

25 La descripción también se refiere a una composición de IL-18BP que tiene un perfil de glicofomas que comprende de aproximadamente 0% a aproximadamente 15% de glicofomas básicas, de aproximadamente 15% a aproximadamente 30% de glicofomas menos ácidas, de aproximadamente 45% a aproximadamente 65% de glicofomas ácidas, y de aproximadamente 10% a aproximadamente 25% de glicofomas muy ácidas.

30 El perfil de glicofomas se caracteriza mediante una electroforesis capilar de zonas (CZE), que indica el grado de glicofomas básicas, menos ácidas, ácidas y muy ácidas de la IL-18BP. El método, y una definición de las glicofomas básicas, menos ácidas, ácidas y muy ácidas, puede extraerse de los ejemplos que aparecen a continuación.

35 El número de carga hipotético Z es un parámetro calculado según una fórmula conocida (Hermentin et al., 1996; Gervais et al., 2003; véanse también los ejemplos que aparecen a continuación), y caracteriza el grado de sialilación de las glicoproteínas.

La composición de IL-18BP se caracteriza por un número Z que varía entre aproximadamente 130 a aproximadamente 160, preferiblemente entre aproximadamente 140 y 155, más preferiblemente entre aproximadamente 145 y aproximadamente 150. Los números Z preferidos para IL-18BP son, por ejemplo, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, ó 156.

40 Aunque las composiciones de IL-18BP pueden producirse mediante cualquier proceso tal como, por ejemplo, procesos de perfusión ejecutados con ajustes de parámetros diferentes a los descritos en la presente, por ejemplo a unas velocidades de perfusión mayores, las composiciones de IL-18BP se producen preferiblemente con el proceso discontinuo de la presente invención.

45 Según la presente invención, la IL-18BP que se va a producir puede ser cualquier IL-18BP de cualquier especie. Preferiblemente, es la IL-18BP humana.

Puesto que la IL-18BP es una proteína soluble segregada, se libera hacia el sobrenadante del cultivo celular, a través de su péptido señal natural, o a través de un péptido señal heterólogo, es decir, un péptido señal derivado de otra proteína segregada que puede ser más eficaz en el sistema de expresión particular utilizado tal como, por ejemplo, el péptido señal GH.

50 La expresión "proteína de unión a IL-18" se emplea en la presente como sinónimo de "IL-18BP". Esta expresión se

refiere a proteínas de unión a IL-18, tales como las definidas en el documento WO 99/09063, o en Novick et al., 1999. El término IL-18BP incluye los variantes de corte y empalme y/o isoformas de las proteínas de unión a IL-18, como las definidas en Kim et al., 2000, en particular las isoformas humanas a y c de IL-18BP.

5 El término "IL-18BP", tal como se emplea en la presente, incluye también muteínas, derivados funcionales, fracciones activas, proteínas condensadas, proteínas circularmente permutadas, y sales de IL-18BP, según se define en el documento WO 99/09063.

10 Tal como se emplea en la presente, el término "muteínas" se refiere a análogos de una IL-18BP, o análogos de una IL-18BP vírica, en los que uno o más de los restos aminoácidos de una IL-18BP natural o una IL-18BP vírica están reemplazados por restos aminoácidos diferentes, o están deletionados, o uno o más restos aminoácidos se añaden a la secuencia natural de una IL-18BP o de una IL-18BP vírica, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes comparado con la IL-18BP de tipo salvaje o la IL-18BP vírica. Estas muteínas se preparan mediante síntesis conocidas y/o mediante técnicas de mutagénesis dirigida a sitio, o mediante cualquier otra técnica adecuada para ello.

15 Las muteínas incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida con ADN o ARN, que codifica una IL-18BP o que codifica una IL-18BP vírica. (WO 99/09063) bajo condiciones rigurosas. La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a unas condiciones de hibridación y posterior lavado que los expertos en la técnica denominan de modo convencional "rigurosas". Véase Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, N.Y., §§6.3 y 6.4 (1987, 1992). Sin limitación, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen unas condiciones de lavado 12-20 °C por debajo de la T_m calculada del híbrido que se está estudiando, por ejemplo en 2 x SSC y SDS al 0,5% durante 5 minutos, 2 x SSC y SDS al 0,1% durante 15 minutos; 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 37 °C durante 30-60 minutos, y después 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 68 °C durante 30-60 minutos. Los expertos en la técnica comprenderán que las condiciones rigurosas dependen también de la longitud de las secuencias de ADN, las sondas oligonucleotídicas (tales como de 10-40 bases) o las sondas oligonucleotídicas mixtas. Si se emplean sondas mixtas resulta preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase Ausubel, supra.

25 La coincidencia refleja una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas, o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinada mediante la comparación de las secuencias. En general, la coincidencia se refiere a la correspondencia exacta nucleótido a nucleótido, o aminoácido a aminoácido, de las dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, respectivamente, a lo largo de la longitud de las secuencias que se están comparando.

30 Para secuencias en que no existe una correspondencia exacta, puede determinarse un "porcentaje de coincidencia". En general, las dos secuencias que se van a comparar se alinean para producir una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "huecos" en una o ambas secuencias, para potenciar el grado de alineamiento. Puede determinarse un porcentaje de coincidencia a lo largo de la longitud completa de cada una de las secuencias que se están comparando (denominado alineamiento global), que resulta particularmente adecuado para secuencias con la misma longitud o con una longitud similar, o a lo largo de unas longitudes más cortas, definidas (denominado alineamiento local), que resulta más adecuado para secuencias con longitud desigual.

35 Los métodos para comparar la coincidencia y la homología de dos o más secuencias son muy conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, pueden utilizarse los programas informáticos disponibles en the Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux J. et al., 1984), por ejemplo los programas informático BESTFIT y GAP, para determinar el porcentaje de coincidencia entre dos polinucleótidos, y el porcentaje de coincidencia y el porcentaje de homología entre dos secuencias polipeptídicas. BESTFIT emplea el algoritmo de "homología local" de Smith and Waterman (1981), y encuentra la mejor región individual de similitud entre las dos secuencias. Otros programas para determinar la coincidencia y/o la similitud entre secuencias también se conocen en la técnica, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul S.F. et al, 1990; Altschul S.F. et al, 1997, accesibles desde la página principal de NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W.R., 1990).

40 Cualquiera de estas muteínas preferiblemente tiene una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de una IL-18BP, o suficientemente duplicativa de la de una IL-18BP vírica, de forma que tenga una actividad sustancialmente similar a la IL-18BP. Una actividad de IL-18BP es su capacidad para unirse a IL-18. Siempre que la muteína tenga una actividad de unión a IL-18 sustancial puede utilizarse para la purificación de IL-18, por ejemplo mediante una cromatografía de afinidad y, por tanto, puede considerarse que tiene una actividad sustancialmente similar a la IL-18BP. Por tanto, puede determinarse si cualquier muteína dada tiene sustancialmente la misma actividad que la IL-18BP mediante la experimentación habitual, que comprende someter a dicha muteína, por ejemplo, a un ensayo de competición simple de "sandwich" para determinar si se une o no a una IL-18 marcada de modo apropiado, tal como un radioinmunoensayo o un ensayo ELISA.

55 En una realización preferida, cualquiera de estas muteínas tiene al menos 40% de coincidencia u homología con la secuencia de una IL-18BP o de un homólogo de IL-18BP codificado por un virus, según se define en el documento WO 99/09063. Más preferiblemente, tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o, más preferiblemente, al menos 90% de coincidencia u homología con ésta.

Las muteínas de polipéptidos de IL-18BP o las muteínas de IL-18BP víricas que pueden utilizarse, o el ácido nucleico que las codifica, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como polinucleótidos o péptidos de sustitución que pueden ser obtenidos de modo habitual por los expertos en la técnica, sin experimentación indebida, basándose en las enseñanzas y las guías presentadas en la presente.

- 5 Los cambios preferidos para muteínas son las conocidas como sustituciones “conservativas”. Las sustituciones de aminoácidos conservativas de polipéptidos o proteínas de IL-18BP, o de IL-18BP víricas, pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tengan propiedades fisicoquímicas suficientemente similares de forma que una sustitución entre miembros del grupo conservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Es evidente que también pueden realizarse inserciones y deleciones de aminoácidos en las secuencias definidas anteriormente sin alterar su función, en particular si las inserciones o las deleciones sólo implican a unos pocos aminoácidos, por ejemplo, a menos de treinta, y preferiblemente a menos de diez, y si no eliminan o desplazan a aminoácidos que sean críticos para una conformación funcional, por ejemplo restos cisteína. Las proteínas y las muteínas producidas mediante estas deleciones y/o inserciones están dentro del ámbito de la presente descripción.
- 10 Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los que se definen en la tabla 4. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los que se definen en la tabla 5, y lo más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los que se definen en la tabla 6.

Tabla I: Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Tabla II: Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo

Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

Tabla III: Grupos aún más preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser

His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Trp

5 Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden utilizarse para obtener muteínas de polipéptidos o proteínas de IL-18BP, o de muteínas de IL-18BP víricas, incluyen cualquier etapa de un método, tales como las presentadas en las patentes de EEUU 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, de Mark et al.; 5.116.943, de Koths et al., 4.965.195, de Namen et al.; 4.879.111, de Chong et al.; y 5.017.691, de Lee et al.; y las proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de EEUU nº 4.904.584 (Shaw et al.).

10 La expresión “proteína de fusión” se refiere a un polipéptido que comprende una IL-18BP, o una IL-18BP vírica, o su muteína o fragmento, condensado con otra proteína que, por ejemplo, tenga un tiempo de permanencia prolongado en los fluidos corporales. Una IL-18BP, o una IL-18BP vírica, puede por tanto estar condensada con otra proteína, polipéptido o similares, por ejemplo una inmunoglobulina o un fragmento de ésta.

15 Los “derivados funcionales”, tal como se emplean en la presente, abarcan a derivados de IL-18BP, o de una IL-18BP vírica, y sus muteínas y proteínas condensadas, que pueden prepararse a partir de grupos funcionales que aparecen en las cadenas laterales sobre los restos o los grupos N- o C-terminales, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la descripción con la condición de que sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, que no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la IL-18BP, o de IL-18BP víricas, y que no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que las contienen.

20 Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden ocultar los sitios antigénicos y extender la permanencia de una IL-18BP o de una IL-18BP vírica en los fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo mediante una reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos amino libres de los restos aminoácidos formados con restos acilo (por ejemplo, grupos alcanóilo, o aroílo carbocíclico) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de los restos serilo o treonilo) formados con restos acilo.

25 Como “fracciones activas” de una IL-18BP, o de una IL-18BP vírica, sus muteínas y proteínas condensadas, la presente descripción cubre cualquier fragmento o precursor de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína por sí sola o junto con moléculas asociadas o restos unidos a ella, por ejemplo restos azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o los restos azúcar por sí solos, con la condición de que dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a la IL-18BP.

30 El término “sales” en la presente se refiere a sales de grupos carboxilo y a sales de adición de ácidos de grupos amino de una molécula inhibidora de IL-18 o sus análogos. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo sales de sodio, calcio, amonio, sales férricas o de cinc y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácidos incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, todas estas sales deben mantener la actividad biológica del inhibidor de IL-18, tal como la inducción de IFN-gamma en células sanguíneas.

35 Las secuencias de la IL-18BP y sus variantes de corte y empalme/isoformas puede obtenerse en el documento WO 99/09063 o en Novick et al., 1999, así como en Kim et al., 2000.

40 Los derivados funcionales de la IL-18BP pueden conjugarse con polímeros para mejorar las propiedades de la proteína, tales como la estabilidad, la semivida, la biodisponibilidad, la tolerancia por el cuerpo humano, o la inmunogenicidad. Para lograr este objetivo, la IL-18BP puede unirse, por ejemplo, a polietilenglicol (PEG). La pegilación puede realizarse mediante métodos conocidos, descritos en el documento WO 92/13095, por ejemplo.

Una proteína de fusión de IL-18BP puede comprender, por ejemplo, una fusión de una inmunoglobulina, es decir, el inhibidor de IL-18 es una proteína condensada que comprende toda o parte de una proteína de unión a IL-18, que

5
10
está condensada con toda o con una parte de una inmunoglobulina. Los métodos para fabricar proteínas de fusión de inmunoglobulinas son muy conocidos en la técnica, tales como los descritos en el documento WO 01/03737, por ejemplo. Los expertos en la técnica apreciarán que la proteína de fusión resultante sustancialmente mantiene la actividad biológica de IL-18BP tal como, por ejemplo, la unión a IL-18, que puede medirse en ensayos *in vitro* descritos en la técnica anterior tal como, por ejemplo, el documento WO 99/09063. La fusión puede ser directa o a través de un péptido conector corto, que puede ser tan corto como de 1 a 3 restos aminoácidos de longitud, o mayor, por ejemplo 13 restos aminoácidos de longitud. Dicho conector puede ser un tripéptido con la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia conectora de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gin-Phe-Met introducida entre la secuencia de IL-18BP y la secuencia de la inmunoglobulina. La proteína de fusión resultante tiene mejores propiedades, tales como un mayor tiempo de permanencia en los fluidos corporales (semivida), una mayor actividad específica, un mayor nivel de expresión, o bien se facilita la purificación de la proteína de fusión.

15
En una realización preferida, la IL-18BP se condensa con la región constante de una molécula de Ig, por ejemplo una porción Fc de una inmunoglobulina. Preferiblemente, se condensa con las regiones de cadena pesada, como los dominios CH2 y CH3, opcionalmente con la región bisagra de la IgG1 humana, por ejemplo. La parte Fc puede estar mutada, por ejemplo, para evitar actividades no deseadas, tales como la unión al complemento, la unión a receptores de Fc, o similares.

20
La generación de proteínas de fusión específicas que comprendan IL-18BP y una porción de una inmunoglobulina se describe en el ejemplo 11 del documento WO 99/09063, por ejemplo. Otras isoformas de moléculas de Ig también son adecuadas para la generación de proteínas de fusión, tales como las isoformas IgG₂ o IgG₄, u otras clases de Ig, como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monoméricas o multiméricas, hetero- u homodiméricas.

25
Otras proteínas de fusión de IL-18BP pueden prepararse mediante la condensación de dominios aislados a partir de otras proteínas que permiten la formación de dímeros, trímeros, etc. Los ejemplos de secuencias de proteínas que permiten la multimerización de los polipéptidos son los dominios aislados a partir de proteínas tales como hCG (documento WO 97/30161), colágeno X (documento WO 04/33486), C4BP (documento WO 04/20639), proteínas Erb (documento WO 98/02540), o péptidos de espiral helicoidal (documento WO 01/00814).

30
La IL-18BP producida según el proceso de la invención, o la composición según se describe en la presente, puede estar prevista para un uso terapéutico, es decir, para la administración a pacientes. Si la IL-18BP se administra a pacientes, preferiblemente se administra por vía sistémica, y preferiblemente por vía subcutánea o intramuscular, o tópica, es decir, de modo local. También puede resultar adecuada la administración rectal o intratecal, dependiendo del uso específico de la IL-18BP.

Con este objetivo, la IL-18BP producida puede formularse como composición farmacéutica, es decir, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, o similares.

35
La definición de "farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo, y que no sea tóxico para el receptor al cual se le administra. Por ejemplo, para la administración parenteral, la proteína o proteínas activas pueden formularse en una forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como disolución salina, disolución de dextrosa, albúmina de suero y disolución de Ringer.

40
45
Los ingredientes activos de la composición farmacéutica según se describe en la presente pueden administrarse a un individuo en una diversidad de formas. Las vías de administración incluyen la administración intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, intracraneal, epidural, tópica, rectal e intranasal. Puede utilizarse cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo la absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales, o mediante terapia génica, en la que una molécula de ADN que codifica el agente activo se administra al paciente (por ejemplo, a través de un vector), que provoca que el agente activo se exprese y se segregue *in vivo*. Además, la proteína o proteínas pueden administrarse junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

50
Para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular), la proteína o proteínas activas pueden formularse como una disolución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, disolución salina, disolución de dextrosa) y aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o la estabilidad química (por ejemplo, conservantes y tampones). La formulación se esteriliza mediante técnicas que se emplean habitualmente.

55
Las cantidades terapéuticamente eficaces de la proteína o proteínas activas estarán en función de muchas variables, incluyendo el tipo de antagonista, la afinidad del antagonista por IL-18, cualquier actividad citotóxica residual que muestren los antagonistas, la vía de administración, la condición clínica del paciente (incluyendo el deseo de mantener un nivel no tóxico de actividad IL-18 endógena).

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es aquella que cuando se administra, el inhibidor de IL-18 produce la inhibición de la actividad biológica de IL-18. La dosificación administrada, como una dosis única o múltiple, a un individuo varía dependiendo de una diversidad de factores, que incluyen las propiedades farmacocinéticas del inhibidor de IL-18, la vía de administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), el grado de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y la manipulación de los intervalos de dosificación establecidos están dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, así como los métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar la inhibición de la IL-18 en un individuo.

La IL-18BP puede utilizarse en cantidades dentro de intervalos de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg, o de aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 1 a 3 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal.

La IL-18BP puede administrarse a diario o en días alternos, o tres veces por semana o una vez por semana, en dosis similares, o en dosis que aumentan o disminuyen con el tiempo.

Las dosis diarias habitualmente se administran en dosis divididas o en una forma de liberación sostenida eficaz para obtener los resultados deseados. La segunda o posteriores administraciones pueden realizarse a una dosificación que sea la misma, menor o mayor que la dosis inicial o previa administrada al individuo. La segunda o posterior administración puede administrarse durante la enfermedad o antes de la aparición de ésta.

La IL-18BP puede administrarse de modo profiláctico o terapéutico a un individuo antes, de modo simultáneo o secuencial con otros agentes o regímenes terapéuticos (por ejemplo, regímenes de múltiples fármacos) en cantidades terapéuticamente eficaces.

La IL-18BP producida según la presente invención puede utilizarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una serie de enfermedades o trastornos. Estas enfermedades o trastornos, por ejemplo, pueden ser trastornos mediados por la IL-18. Por ejemplo, la IL-18BP puede utilizarse para el tratamiento y/o la prevención de la psoriasis, la artritis psoriática, la enfermedad de Crohn, la enfermedad del intestino inflamatoria, la artritis reumatoide, las lesiones hepáticas, tales como la cirrosis hepática alcohólica, la sepsis, la aterosclerosis, las enfermedades cardíacas isquémicas, las alergias, en particular la hipersensibilidad de tipo retrasado, y las lesiones de cabeza cerradas.

La referencia a etapas del método conocidas, a etapas del método convencionales, a métodos conocidos o a métodos convencionales no supone la admisión de que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención se describa, enseñe o sugiera en la técnica pertinente. Debe entenderse que la fraseología o la terminología en la presente se utiliza de modo descriptivo y no como limitación, de modo que la terminología o la fraseología de la presente descripción debe ser interpretada por los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas y las guías presentadas en la presente, en combinación con el conocimiento de los expertos en la técnica.

Ejemplos (referencia)

Ejemplo 1: Proceso de perfusión para la producción de IL-18BP humana recombinante a partir de una recolección de células CHO sin suero en un biorreactor de lecho cargado

Este ejemplo describe un proceso basado en el cultivo de alta densidad celular de células CHO recombinantes en un biorreactor de lecho cargado, en el que la velocidad de perfusión se ajusta según las necesidades de crecimiento celular durante la fase de crecimiento, y después se reduce de forma pronunciada durante la fase de producción sin comprometer la productividad del proceso o la calidad de la proteína.

El producto de proteína producido mediante este proceso, la IL-18BP, se caracteriza y resulta tener un perfil de N-glicanos ventajoso.

Un proceso de primera generación había sido diseñado originariamente con el objetivo de producir con rapidez un material para ensayos preclínicos y clínicos tempranos.

Este proceso se diseñó con una velocidad de perfusión alta de 2,6 vvd para suministrar una alta densidad celular (aproximadamente $2,5 \cdot 10^7$ células·ml⁻¹ de lecho cargado) con medio fresco durante la fase de producción. En este proceso de primera generación, la degradación del producto no resultaba un problema, puesto que la alta velocidad de dilución impuesta al cultivo mantenía un tiempo de permanencia bajo del producto, la IL-18BP, en el entorno del biorreactor.

En una etapa posterior del desarrollo, se ensayó una reducción en la velocidad de perfusión del medio en -25% y -50% para mejorar el proceso. Se empleó un sistema a pequeña escala para realizar los ensayos, y las condiciones seleccionadas entonces se implementaron a escala piloto para producir más material para ensayos clínicos con un proceso de segunda generación mejorado.

Materiales y métodos*Cultivo celular - sistema experimental*

5 Un biorreactor de lecho cargado (Ducommun et al., 2002a; Ducommun et al., 2002b) con vehículo Fibrá-Cel® (Bibby Sterilin, Reino Unido) se empleó para cultivar células CHO (Laboratoires Serono S.A., Corsier-sur-Vevey, Suiza) que expresan y segregan la IL-18BP en un medio sin suero (Sigma C-9486). En el sistema a pequeña escala que se empleó para investigar una reducción en la velocidad de perfusión, el biorreactor y el lecho cargado tenían un volumen de trabajo de 15 y 5 litros, respectivamente.

El biorreactor se perfusionó con 2,6 vvd (según se define en la tabla 1) durante la fase de crecimiento y producción. Esta velocidad de perfusión básica se elige como el 100% de referencia, indicada como ejecución-100.

10 Tabla 1: Velocidades de perfusión ensayadas durante la fase de producción para la ejecución-100, ejecución-75 y ejecución-50. Media de n replicaciones (± 2 desviaciones estándar para la ejecución-100)

	Velocidad de perfusión (l·kg _{Fibra-Cel} ⁻¹ ·día ⁻¹)	Velocidad de dilución (vvd*)	Replicaciones (n)
Ejecución-100	100 \pm 3,5	2,6 \pm 0,1	8
Ejecución-75	75	2,0	3
Ejecución-50	50	1,3	2

* La velocidad de dilución D expresada en vvd se calcula como litro de medio por litro del volumen de trabajo del sistema total por día (volumen total = lecho cargado + volumen del tanque de acondicionamiento).

15 Estas condiciones se aplicaron para todos los conjuntos de experimentos del biorreactor: el medio se perfusionó a 100% durante la fase de crecimiento a 37 °C. La temperatura se reguló a 37,0 °C durante la fase de crecimiento, y después se redujo en dos etapas hasta 32,5 °C. El pH se reguló a 7,00, y la concentración de oxígeno disuelto (DO) se mantuvo al 70% de saturación del aire a través de todo el cultivo.

20 Debido al hecho de que el recuento de células y la determinación del número de células en un biorreactor de lecho cargado es un análisis complejo e impreciso, los inventores utilizaron la velocidad de consumo de glucosa (GCR) como un método indirecto para estimar el crecimiento y la densidad celular en el biorreactor de lecho cargado. En el sistema de los inventores se determinó, mediante recuentos de células directos en una serie de cultivos en el lecho cargado, que una GCR de 300 gramos de glucosa por kilogramo de discos Fibrá-Cel® por día se corresponde con aproximadamente $2,5 \cdot 10^7$ células por ml de volumen del biorreactor de lecho cargado (los datos no se muestran).

25 Esta etapa se ha definido como el final de la fase de propagación celular a 37 °C, y cuando la GCR ha alcanzado un nivel de 300 gramos de glucosa por kilogramo de discos Fibrá-Cel® por día, los cultivos se cambiaron de 37,0 °C al modo de producción disminuyendo la temperatura hasta 33,5 °C. En esta etapa, en un conjunto de biorreactores, la perfusión se mantuvo al 100% (ejecución-100) y en los otros dos conjuntos se utilizó una velocidad de perfusión del medio del 75% (ejecución-75) y 50% (ejecución-50) del nivel máximo, tal como se resume en la tabla 1. La temperatura disminuyó aún más hasta 32,5 °C en una etapa posterior de la fase de producción para evitar un mayor crecimiento celular y para estimular la producción.

30 En la sección de resultados, las barras que aparecen en las figuras representan un intervalo de 4 desviaciones estándar (± 2 desviaciones estándar) medido para las 8 replicaciones ensayadas con las condiciones de la ejecución-100.

Ensayos

35 Las muestras se retiraron a diario durante el cultivo. Se cuantificaron las concentraciones de glucosa y lactato con un analizador EML 105 (Radiometer Medical A/S, Brønshøj, Dinamarca).

La IL-18BP recombinante producida se cuantificó con un ensayo ELISA.

40 La calidad de la proteína recombinante se evaluó con un método de RP-HPLC, en combinación con métodos de SDS-PAGE (ExcelGel SDS Homogeneous 12,5% (nº de catálogo 80-1261-01, Pharmacia). Los geles se tiñeron de modo específico mediante una transferencia Western para detectar los variantes de IL-18BP de alto peso molecular (es decir, dímeros, agregados) o de bajo peso molecular. También se utilizó una tinción no específica mediante un tinte de plata para evaluar la intensidad relativa de la IL-18BP comparada con las impurezas después del barrido (escáner ARCUS 2, Afga) de las bandas individuales para determinar su intensidad relativa.

5 La sialilación de las proteínas, y en particular la abundancia de N-glicanos neutros, mono-, di-, tri- y tetrasialilados se analizó mediante la separación de los N-glicanos según su carga, según se describe en Gervais et al., 2003. Los N-glicanos se escindieron de modo específico de la IL-18BP mediante hidrazinólisis (N-glicanasa E-5006B o E-5006C, Glyko, Inc.), se marcaron con el tinte fluorescente 2-aminobenzamida (kit de marcaje de señal 2-AB K404, Glyko Inc.), y se separaron mediante una columna de cromatografía antes de hacerlos pasar a través de un detector fluorescentes. Las proporciones de las especies de N-glicanos entonces pudieron determinarse después de la integración de los picos de HPLC que se corresponden con las formas neutras, mono-, di-, tri- y tetrasialiladas.

Resultados

Reducción de la velocidad de perfusión

10 El primer intento fue reducir la velocidad de perfusión desde 2,6 vvd a 2,0 vvd y 1,3 vvd durante la fase de producción (figura 1) y seguir su efecto sobre el metabolismo celular, la productividad volumétrica y la calidad del producto.

La concentración de glucosa y lactato se midió para las tres velocidades de perfusión (figura 2A y 2B), y el nivel de glucosa residual se mantuvo por encima de 0,5 g/l.

15 Los resultados en la figura 3 muestran los niveles de velocidad de consumo de glucosa (GCR) para los tres conjuntos de velocidades de perfusión del medio ensayados. Estos resultados indican que una velocidad de perfusión reducida induce una menor GCR del cultivo. Sin embargo, este efecto es apenas significativo, y cuando la velocidad de perfusión del medio se redujo en -25% y -50%, la GCR media medida a lo largo de la fase de producción de 60 días se redujo en -8% y -15%, respectivamente (figura 3).

20 En paralelo, la proporción molar aparente (figura 4) de la conversión de glucosa en lactato $Y_{lac/glu}$ disminuyó ligeramente en respuesta a una menor velocidad de perfusión, pero permaneció en el intervalo de 1,55 a 1,65 mol de lactato producido por mol de glucosa consumida. La diferencia observada en la proporción de $Y_{lac/glu}$ no fue estadísticamente significativa, puesto que todos los puntos de datos medidos para las ejecuciones del ensayo a unas velocidades de perfusión reducidas están comprendidas dentro de ± 2 desviaciones estándar de los valores obtenidos con las ejecuciones de referencia.

Productividad del proceso

Los resultados presentados en la figura 5A, B y C muestran una comparación de la proteína recombinante producida (productividad volumétrica, producción total, y valoración) en la ejecución-100 de referencia y en las ejecuciones con una perfusión del medio reducida.

30 Cuando la velocidad de perfusión del medio se redujo en -25% y -50%, la productividad volumétrica media se redujo en -3% y -30%, respectivamente (figura 5A). El resultado de productividad menor obtenido en la ejecución-50 era estadísticamente diferente de las condiciones de referencia.

35 Otra diferencia observada en la figura 5A es la disminución de la productividad volumétrica a lo largo del tiempo a través de la fase de producción. Se observó una productividad volumétrica estable para la ejecución-100 y la ejecución-75, pero en la ejecución-50 la productividad disminuyó a lo largo de la duración de la fase de producción de 60 días. De manera más específica, el nivel de productividad de la ejecución-50 fue del 60% del valor de referencia al final de la fase de producción de 60 días.

La menor productividad de la ejecución-50 también se muestra en la figura 5B, que representa la cantidad acumulada de producto fabricado a lo largo de la fase de producción de 60 días.

40 Las valoraciones correspondientes medidas para las diferentes velocidades de perfusión se presentan en la figura 5C, que demuestra que las valoraciones de proteínas recombinantes aumentaron en +25% y +50%, respectivamente, en oposición al control, en el que la perfusión disminuyó en -25% y -50%.

Calidad del producto

45 Con la reducción en la velocidad de perfusión desde 2,6 vvd a 2,0 vvd y 1,3 vvd que se ensayó en la ejecución-100, la ejecución-75 y la ejecución-50, el tiempo de permanencia (t) de la proteína recombinante aumentó desde 0,4 a 0,5 y 0,8 días, respectivamente ($t = 1/D$).

50 Puesto que una mayor exposición al entorno en el biorreactor puede conducir potencialmente a la degradación de la proteína recombinante, se realizó un estudio de estabilidad antes de iniciar los ensayos en los biorreactores A. Una muestra de IL-18BP se sembró en el medio de cultivo celular, y se controlaron los atributos de calidad de la IL-18BP después de 1, 2 y 5 días de incubación a 37 °C. Puesto que no se detectaron señales de degradación del producto mediante el método indicador de la estabilidad (los datos no se muestran), se decidió continuar con los experimentos en el biorreactor.

5 Durante los ensayos en los biorreactores, la proteína recombinante se purificó hasta la homogeneidad en tres puntos de los ensayos en el biorreactor (día 20, 40 y 60) para verificar que la calidad del producto se mantiene para cada velocidad de perfusión ensayada. Las condiciones de la ejecución-50 se consideraron el peor caso para la degradación de las proteínas, puesto que esta ejecución tiene la velocidad de perfusión menor y el mayor tiempo de permanencia del producto en el biorreactor.

10 Para evaluar si la calidad del producto se ve afectada por la velocidad de perfusión reducida, se analizaron masas finales de la ejecución-50 mediante una tinción con plata de SDS-PAGE y un análisis de la transferencia Western de SDS-PAGE, y se comparó con el perfil obtenido en las condiciones de referencia de la ejecución-100. Los correspondientes datos obtenidos para una masa producida con IL-18BP recolectada en los días 47-48 de la fase de producción de la ejecución-50 produjeron las bandas individuales esperadas a un peso molecular de aproximadamente 40 kDa (los datos no se muestran). No se detectaron modificaciones en los atributos de calidad de la IL-18BP en la ejecución-50 comparado con la ejecución-100. La pureza electroforética medida mediante la tinción con plata de SDS-PAGE fue mayor que 99% de pureza para todos los carriles, y no pudo detectarse la presencia de agregados o de formas truncadas, tal como se muestra en el análisis de la transferencia Western de SDS-PAGE (no se muestra).

15 El nivel mayor de pureza (aproximadamente 100%) de la IL-18BP producida se confirmó mediante RP-HPLC para la ejecución-100, la ejecución-75 y la ejecución-50.

20 Por último, la cantidad de impurezas derivadas de la célula CHO hospedante (HCP, "Host Cell Proteins", proteínas de la célula hospedante) en la proteína producida se cuantificó mediante HCP-ELISA (los datos no se muestran) y se descubrió que era coherente entre la ejecución-50, la ejecución-75 y la ejecución-100.

Perfil de N-glicanos

25 Muestras de la IL-18BP recombinante producida se sometieron a un cartografiado de N-glicanos según el método indicado anteriormente, para cuantificar la proporción de las diferentes formas sialiladas de la proteína de interés. Los resultados del cartografiado de los N-glicanos resumidos en la tabla 2 demuestran que se obtienen proporciones comparables de N-glicanos para todas las velocidades de perfusión ensayadas. Esto también se ve ilustrado por los correspondientes perfiles de HPLC indicados en la figura 6.

Tabla 2: Fracción de moléculas de N-glicano sialiladas de modo diferente (indicado como porcentaje de los grupos N-glicano) en muestras semiproducidas de sustancia fármaco para la ejecución-100, la ejecución-75 y la ejecución-50

	Fracción de moléculas de N-glicano sialiladas de modo diferente				
	Neutras (%)	Monosialiladas (%)	Disialiladas (%)	Trisialiladas (%)	Tetrasialiladas (%)
Ejecución-100	19-21	21-29	39-44	7-11	2-4
Ejecución-75	18-22	20-23	44-50	8-9	3-4
Ejecución-50	19-21	20-25	45-48	8-10	2-4

30 Una comparación de estos datos demuestra que la sialilación del producto no se ve alterada por la velocidad de perfusión reducida, y los datos obtenidos para la ejecución-75 y la ejecución-50 están claramente dentro del intervalo obtenido bajo las condiciones patrón de la ejecución-100.

Resumen y conclusiones

35 En el presente estudio, se determinó la velocidad de perfusión del medio óptima que se va a utilizar para el cultivo continuo de una línea de células CHO recombinante en un biorreactor de lecho cargado fabricado con vehículos de discos Fibra-Cel®.

40 Un proceso de primera generación había sido diseñado originariamente con una alta velocidad de perfusión, y se había hecho funcionar originariamente con una perfusión de 2,6 vvd durante la fase de producción para suministrar una alta densidad celular (aproximadamente $2,5 \cdot 10^7$ células·ml⁻¹ del lecho cargado) con suficiente medio fresco.

Para mejorar el coste económico de este proceso se investigó a pequeña escala una reducción en la velocidad de perfusión del medio en -25% y -50%. La mejor opción entonces se aplicó a escala piloto para producir más material para ensayos clínicos con un proceso de segunda generación mejorado.

Con una reducción de -25% de la velocidad de perfusión, la productividad volumétrica se mantuvo comparada con el

proceso de primera generación, pero se obtuvo una pérdida de productividad de -30% cuando se redujo aún más la velocidad de perfusión del medio hasta -50% de su nivel original.

5 La calidad de la proteína bajo condiciones de velocidad de perfusión reducida se analizó para determinar la pureza, el nivel de sialilación de los N-glicanos, la abundancia de dímeros o agregados, y se demostró que la calidad de la sustancia de fármaco final era comparable a la obtenida en condiciones de alta perfusión.

10 En este estudio se estableció que la calidad del producto se mantiene tras la reducción de la velocidad del medio de perfusión. El ensayo con la perfusión menor, la ejecución-50, tenía el tiempo de permanencia mayor ($t = 0,8$ días) y este es el peor caso para la estabilidad de las proteínas, puesto que deja al producto expuesto a todas las actividades potencialmente degradantes presentes en el entorno del biorreactor durante el tiempo mayor. Bajo estas condiciones, se puede considerar que 99% de la proteína tendrá un tiempo de permanencia en el sistema del biorreactor menor que 4 días ($5t = 4$ días para la ejecución-50).

15 Puesto que el estudio de estabilidad demuestra que la IL-18BP puede conservarse hasta 4 días a 37 °C en la recolección bruta sin alteraciones significativas, se anticipa que en el intervalo de velocidades de perfusión ensayado, el producto no se degradará. Esto se confirmó mediante los resultados obtenidos en las ejecuciones en el biorreactor, puesto que todos los lotes de proteína producida generados en el día de producción 20, 40 y 60 de cada una de las condiciones de perfusión ensayadas cumplía con las especificaciones establecidas con el material de referencia de la ejecución-100. Por tanto, en el estudio indicado en la presente, no pudieron detectarse señales de degradación del producto.

20 La privación de la glucosa es una causa típica de la sialilación incorrecta del producto (Goochee y Monica, 1990). Este efecto ha sido estudiado para la IFN-g producida a partir de células CHO, y se descubrió que el producto de la glicosilación se ve afectado con unos niveles residuales bajos de glucosa inferiores a 0,1 g/l (Hayter et al., 1993), (Hooker et al., 1995).

25 En las condiciones indicadas en la presente, la sialilación de la IL-18BP no se vió afectada por las menores concentraciones de glucosa alcanzadas durante la fase de producción de la ejecución-75 y la ejecución-50. Sin desear limitarse a una explicación específica, esto puede explicarse por el hecho de que el intervalo de concentraciones residuales de glucosa (de 2,6 g/l a 0,5 g/l) indicadas en la presente todavía son mucho mayores que el valor menor que 0,1 g/l de nivel de glucosa (que puede inducir un pequeño efecto de privación de glucosa) para el cual se ha observado una sialilación incompleta de IFN-g.

30 Basándose en los resultados obtenidos a pequeña escala, se aplicó una reducción de -25% de la perfusión del medio a escala piloto en un proceso de segunda generación, lo cual permitió mantener la misma productividad y la misma calidad de la molécula mientras que se reduce el coste del medio, los materiales y la mano de obra del proceso de producción.

35 La reducción de -25% del medio se tradujo directamente en un ahorro de -25% en el medio en polvo y los ingredientes secundarios, los prefiltros y los filtros esterilizantes, las bolsas estériles empleadas para almacenar el medio después de la filtración, y los costes de mano de obra asociados con la preparación del medio, puesto que se necesitaron menos lotes de medio.

40 A medida que la valoración de la IL-18BP aumenta en +25% en el proceso de segunda generación, el procesamiento corriente abajo se beneficia de un ahorro similar: la necesidad de mano de obra se reduce debido a que hay que manipular volúmenes menores, se reduce el tiempo del ciclo de producción, se optimiza el equipo, etc. (los datos no se muestran).

Conclusión

A partir de los resultados obtenidos a pequeña escala, es evidente que la reducción de -25% en la velocidad de perfusión combina ambos beneficios de maximizar la productividad con un ahorro de -25% en el consumo de medio.

45 Una mayor reducción de la velocidad de perfusión hasta -50% conduce a una menor productividad del proceso, que disminuye en -30% bajo estas condiciones. Con unas condiciones de velocidad de perfusión de -50%, la productividad volumétrica disminuyó a lo largo de la duración de la fase de producción de 60 días, mientras que se mantuvo una productividad estable con las velocidades de perfusión mayores ensayadas. La estabilidad del producto se mantuvo en niveles comparables, independientemente de la velocidad de perfusión utilizada en el proceso.

50 **Ejemplo 2: Proceso semicontinuo para la producción de IL-18BP humana recombinante a partir de un cultivo de células CHO sin suero**

También se desarrolló un proceso semicontinuo con células que expresan la IL-18BP humana recombinante en un cultivo en suspensión. Se realizaron tres ejecuciones en total, utilizando biorreactores con un volumen nominal de 5 l ($n = 2$) o 300 l ($n = 1$).

En resumen, los ajustes del cultivo fueron: una concentración de oxígeno del 50% de saturación del aire, pH 7,0 y 6,90, una temperatura de 37,0 °C durante la fase de crecimiento y que después se reduce en dos etapas hasta 29,0 °C. Durante el desarrollo del cultivo semicontinuo, el medio basal sin suero (Sigma, S-9942) se suplementó de modo gradual con una disolución de alimentación concentrada.

5 Los parámetros del proceso semicontinuo se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: Esquema del proceso de fabricación semicontinuo

Tiempo/DT* [día]	T [°C]	pH [pHU]	Alimentación Alimentación-1	Comentarios
-3	Transferir el agrupamiento de inóculos en bolsas de onda hasta el biorreactor de siembra ¹⁾ con unas CV diana de:			CV** = 0,20 ± 0,05 mioCs/ml
0	Transferir el agrupamiento de inóculos del biorreactor de siembra al biorreactor de producción ²⁾ con unas CV diana de:			CV = 0,60 ± 0,10 mioCs/ml
0	37	6,90	+80 g/kg Sobrenadante	c(glucosa) < 1,0 g/l ³⁾
↓	N/A	N/A		
4	® 33	N/A		
↓	N/A	N/A	+30 g/kg Sobrenadante	c(glucosa) < 5,5 g/l ⁴⁾
6	® 29	N/A		
↓	N/A	N/A		
20	Clarificación de la recolección bruta			
¹⁾ Biorreactor de 5 l y 75 l para el funcionamiento a pequeña escala (5 l) y a escala piloto (300 l), respectivamente. ²⁾ Biorreactor de 5 l y 300 l para el funcionamiento a pequeña escala (5 l) y a escala piloto (300 l), respectivamente. ³⁾ La primera adición de la alimentación-1 se produce cuando c(glucosa) < 1,0 g/l (+80 g/kg). ⁴⁾ Las posteriores adiciones de la alimentación-1 se producen cada vez cuando c(glucosa) < 5,5 g/l (+30 g/kg). * DT = días de trabajo ** CV = células viables				

10 Se analizaron importantes indicadores de la actuación, a saber, la densidad celular total, la viabilidad, la concentración de glucosa residual, y la valoración de proteínas. Tal como se muestra en la figura 7(A) a (D), el proceso semicontinuo final permite hacer crecer al clon hasta una densidad celular total máxima de aproximadamente 7,0 mioCs/ml y mantiene la viabilidad celular por encima del 80% hasta el día de trabajo 19, cuando se recolecta el cultivo de 300 l, se clarifica y se captura. La figura 7(C) se corresponde con los perfiles de la concentración de glucosa residual, basándose en mediciones diarias fuera de línea. Estos perfiles ilustran la estrategia de alimentación aplicada. Por ejemplo, la primera adición en embolada de 80 g/kg de sobrenadante se produjo en los tres lotes en el día de trabajo 4 para aumentar la concentración residual de glucosa hasta más de 5,5 g/l. De una manera similar, cada posterior adición de 30 g/kg de sobrenadante puede identificarse con facilidad. Además, la productividad del proceso se muestra en la figura 7(D), con una valoración de r-hIL-18BP final constante de 400 mg/l en el día de trabajo 19. Se evaluó la calidad de las proteínas en los tres lotes en el día de trabajo 19.

20 **Ejemplo 3: Perfil de sialilación de la rhIL-18BP producida en el proceso de perfusión y semicontinuo para un cultivo de células CHO**

Se montó otro proceso de perfusión para la producción de IL-18BP. Las ejecuciones de la perfusión se realizaron con una velocidad de perfusión de 2,75 vvd en un biorreactor que contenía un volumen total de 160 l (incluyendo una columna externa de 40 l) cargado con 4,4 kg de discos Fibracel®, a unas temperaturas de producción de 33,5 °C o 32,5 °C.

25 La IL-18BP producida en este proceso de perfusión se comparó con el material derivado del proceso semicontinuo descrito en el ejemplo 2.

Cada sobrenadante de perfusión o semicontinuo se sometió a una etapa de captura utilizando una cromatografía de afinidad.

30 El material de IL-18BP tras la captura se analizó para la N-glicanación, tal como se describió en el anterior ejemplo 1.

El número de carga hipotético, denominado número Z, se calculó como se describe en Gervais et al. (2003). Brevemente, el número Z se define como la suma de los productos de las áreas respectivas (A) en la región neutra, mono-, di-, tri-, tetra- y pentasialilada de las especies de N-glicanos, cada una multiplicada por la correspondiente carga:

$$Z = A_{(neutra)} \times 0 + A_{(mono)} \times 1 + A_{(di)} \times 2 + A_{(tri)} \times 3 + A_{(tetra)} \times 4 + A_{(penta)} \times 5$$

Los resultados se muestran en la figura 8, que demuestra que, a pesar de algunas diferencias cualitativas principalmente en los grupos disialilados, los datos del cartografiado de los N-glicanos indican que la sialilación del producto es comparable para las condiciones del proceso de perfusión (Z = 149) y semicontinuo (Z = 154), en términos de cantidad.

10 El material de IL-18BP (“material recolectado bruto”), derivado del proceso semicontinuo o derivado del proceso de perfusión, también se analizó mediante una electroforesis capilar de zonas (CZE) para las isoformas con diferente glicosilación (“glicofomas”), según el protocolo descrito en detalle a continuación.

La distribución de las isoformas después se comparó con la IL-18BP purificada, derivada del proceso semicontinuo o de perfusión.

15 El material recolectado bruto se sometió a una etapa de microcaptura en un cartucho Sep-Pak® tC2 (Waters), seguido de una etapa de desalación mediante ultrafiltración Centricon® 10 (Millipore), antes de ser inyectado en el capilar. La IL-18BP purificada se obtuvo fundamentalmente como se describe en la solicitud de patente WO 2005/049649, pero con una etapa de captura diferente basada en una cromatografía de afinidad. Brevemente, las etapas de purificación incluyen una cromatografía de afinidad de iones metálicos (sobre Chelating Sepharose FF), una cromatografía de inducción de carga hidrófoba (sobre Mep Hypercel), una cromatografía de intercambio iónico (sobre CM-Sepharose FF, utilizando la corriente), una cromatografía de interacción hidrófoba (sobre Phenyl Sepharose Fast Flow HS), y una cromatografía en fase inversa (sobre Reverse Phase-Source 30 RPC). El material finalmente purificado se aplicó directamente al capilar sin otra etapa de desalación.

Método

25 **Disoluciones para CZE**

- Tampón fosfato 5 mM de lavado/ensayo de CZE: se prepara mediante una dilución 1:10 de una disolución madre de fosfato 50 mM, pH 7,0. Se filtra a través de un filtro de 0,22 µm. Se prepara fresco.

- NaOH 0,5 M (disolución de lavado de CZE): se añaden 26,2 µl de NaOH al 50% a agua, volumen total de 1 ml. Se prepara fresco.

30 - NaOH 1 M (disolución de regeneración de CZE): se añaden 52,4 µl de NaOH al 50% a agua, volumen total de 1 ml. Se prepara fresco.

- Marcador neutro (dilución 1:10000): se añaden 10 µl de disolución madre de marcador neutro a agua, volumen total de 1 ml. Se añaden 10 µl de esta dilución 1:100 de marcador neutro a agua, volumen total de 1 ml. Se conserva durante tres meses a 4 °C.

35 **Análisis de CZE**

Se trasladan ≥ 20 µl de muestra/referencia a viales de PCR que contienen 1/10 en volumen de marcador neutro, y se mezclan mediante pipeteado inverso, evitando la generación de burbujas.

Parámetros electroforéticos

Se añaden los siguientes reactivos en portadores de viales individuales, evitando la generación de burbujas.

40 Tabla 4: Parámetros electroforéticos para CZE

Reactivos de entrada	Volumen del reactivo	Reactivos de salida	Volumen del reactivo
Tampón de lavado	1,2 ml		
Tampón de ensayo	1,2 ml	Tampón de ensayo (3.3.1)	1,2 ml
Agua purificada	1,2 ml	Agua purificada	1,2 ml
Disolución de lavado de CZE	1,0 ml		

Disolución de regeneración de CZE*	1,0 ml		
Muestra	> 22 µl/vial de PCR		
		Residuo (agua purificada) 1	0,2 ml
		Residuo (agua purificada) 2	0,2 ml
Aire*	Vial vacío		
* se usa sólo si es necesario			

Tabla 5: Programación del análisis CZE

Acontecimiento	Valor	Duración	Vial de entrada	Volumen del reactivo	Vial de salida
Presión de enjuagado	0,138 MPa	2,00 min	Tampón de lavado	1,2 ml	Residuo 1 (0,2 ml)
Presión de inyección	0,003 MPa	5,0 seg	Muestra	≥ 22 µl	Tampón de ensayo (3.3.1)
Voltaje de separación	25 KV	30,00 min	Tampón de ensayo	1,2 ml	Tampón de ensayo (3.3.1)
Presión de enjuagado	0,138 MPa	1,00 min	Tampón de lavado	1,2 ml	Residuo 1 (0,2 ml)
Presión de enjuagado	0,138 MPa	1,00 min	Agua purificada	1,2 ml	Residuo 1 (0,2 ml)
Presión de enjuagado	0,138 MPa	1,00 min	Disolución de lavado de CZE	1,0 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Presión de enjuagado	0,276 MPa	2,00 min	Agua purificada	1,2 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Presión de enjuagado	0,276 MPa	2,00 min	Tampón de lavado	1,2 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Espera			Tampón de lavado	1,2 ml	Tampón de ensayo (3.3.1)

Tabla 6: Programación de la regeneración del capilar de CZE

Acontecimiento	Valor	Duración	Vial de entrada	Volumen del reactivo	Vial de salida
Presión de enjuagado	0,276 MPa	1,00 min	Agua purificada	1,2 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Presión de enjuagado	0,276 MPa	10,00 min	Disolución de regeneración de CZE	1,0 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Presión de enjuagado	0,276 MPa	4,00 min	Agua purificada	1,2 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Presión de enjuagado	0,276 MPa	1,00 min	Tampón de lavado	1,2 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Presión de enjuagado	0,003 MPa	30,00 min	Tampón de lavado	1,2 ml	Residuo 2 (0,2 ml)
Espera			Tampón de ensayo	1,2 ml	Tampón de ensayo (3.3.1)

5

Longitud del capilar al detector/longitud total: 50/60 cm

Polaridad: positiva a negativa (directa)

Temperatura del capilar = 25 ± 2 °C

Temperatura de la bandeja de muestras = 10 ± 2 °C

Detección: 214 nm

Protocolos de inyección

5 Debe haber al menos tres inyecciones del material de referencia patrón para acondicionar el capilar.

- Referencia patrón 1 (inicio)

- Una inyección de muestra 1

- Una inyección de muestra 2

- Una inyección de muestra 3

10 - Una inyección de muestra 4

- Referencia patrón 2 (final)

Nota: para aumentar la reproducibilidad, puede analizarse un máximo de 4 muestras en una secuencia entre la referencia 1 y la referencia 2 utilizando el mismo tampón de ensayo de CZE.

15 Como alternativa, pueden utilizarse para cada muestra dos referencias que forman un intervalo, como se describe a continuación.

Deben realizarse al menos tres inyecciones del material de referencia patrón para acondicionar el capilar.

- Referencia patrón (inicio 1)

- Una inyección de muestra 1

- Referencia patrón (final 1/inicio 2)

20 - Una inyección de muestra 2

- Referencia patrón replicada (final 2/inicio 3)

- Una inyección de muestra 3

- Referencia patrón replicada (final 3)

Análisis de los datos

25 El material de referencia patrón se emplea para la comparación de los datos de las muestras.

Los electroferogramas superpuestos y apilados de las muestras y ambas referencias patrón que forman el intervalo (inicio/final) se imprimen y se archivan.

Determinación de los tiempos de migración MT2 y MT3

30 Se determinan los tiempos de migración MT2 y MT3 en los valles izquierdo y derecho de los picos -3 y +3 de la referencia patrón (inicio). El pico 0 es el pico principal de la referencia.

Clasificación de las isoformas

Debido a la alta acidez del perfil de glicoproteínas de la IL-18BP, las isoformas entre MT2 y MT3 se denominan "isoformas ácidas". Las isoformas con un tiempo de migración mayor que MT3 se denominan "isoformas muy ácidas". Las isoformas con un tiempo de migración menor que MT2 se denominan "isoformas menos ácidas".

35 En algunas circunstancias, puede ser necesario añadir la clase de "isoformas básicas", definida como isoformas con unos tiempos de migración menores que MT1.

Estimación de la abundancia de las isoformas

40 La referencia y cada muestra se analizan utilizando las funciones: *pico manual* entre MT1-M2, MT2-MT3 y MT3-MT4; la *línea de base manual* entre 5 y 28 minutos, y la *integración OFF* entre 0 y MT1, y entre MT4 y 30 minutos. Se modifican las funciones *Anchura* y *Umbral* de forma manual para obtener una integración de tres grupos de picos entre MT1-M2 (isoformas menos ácidas), MT2-MT3 (isoformas ácidas) y MT3-MT4 (isoformas muy ácidas) similar al

mostrado anteriormente para el patrón de referencia.

$$\% \text{ de abundancia de la isoforma} = \frac{\text{área (MT1-MT2 o MT2-MT3 o MT3-MT4)}}{\text{área total (MT1-MT4)}}$$

- 5 Cuando sea necesario, se añade el grupo de picos que se corresponden con las “isoformas básicas” definidas como las isoformas con unos tiempos de migración menores que MT1, y la anterior fórmula se corrige en consecuencia.

Resultados

- 10 Este método de CZE se aplicó a muestras recolectadas brutas (figura 9) y a muestras purificadas para el proceso de perfusión y semicontinuo. A pesar de algunas diferencias observadas para las muestras recolectadas pretratadas (por ejemplo, una mayor proporción de isoformas básicas con el proceso de perfusión), estas isoformas básicas fueron retiradas con éxito mediante una cromatografía de intercambio iónico durante el proceso de purificación (los datos no se muestran). Por tanto, para el producto purificado, se obtuvo un perfil de isoformas comparable para ambos procesos (figura 10).

Referencias bibliográficas

- 15 Altschul S.F. et al. (1990), Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
- Altschul S.F. et al. (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, 25:389-3402.
- 20 Andersen D.C., Bridges T., Gawlitzek M., y Hoy C. (2000), Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in CHO-produced tissue-type Plasminogen Activator, *Biotechnol. Bioeng.*, 70, 1:25-31.
- Chuppa S., Tsai Y.-S., Yoon S., Shackelford S., Rozales C., Bhat R., Tsay G., Matanguihan C., Konstantinov K., y Naveh D. (1997), Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells, *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 2:328-338.
- 25 Devereux J. et al. (1984), A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX, *Nucleic Acids Res.*, 12, 387-395.
- 30 Dowd J.E., Kwok K.E., y Piret J.M. (2001), Glucose-based optimization of CHO-cell perfusion cultures, *Biotechnology and Bioengineering*, 75, 2: 252-256.
- Ducommun P., Kadouri A., von Stockar U., y Marison I.W. (2002a), On-line determination of animal cell concentration in two industrial high-density culture processes by dielectric spectroscopy, *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 3:316-323.
- 35 Ducommun P., Ruffieux P.-A., von Stockar U., y Marison I.W. (2002b), Monitoring of temperature effects on animal cell metabolism in a packed bed process, *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 7:838-842.
- 40 Gervais A., Hammel Y.A., Pelloux S., Lepage P., Baer G., Carte N., Sorokine O., Strub J.M., Koemer R., Leize E., y Van Dorsselaer A. (2003), Glycosylation of human recombinant gonadotrophins: characterization and batch-to-batch consistency, *Glycobiology*, 13, 3:179-189.
- 45 Goldman M.H., James D.C., Rendall M., Ison A.P., Hoare M., y Bull A.T. (1998), Monitoring recombinant human interferon-gamma N-glycosylation during perfused fluidized-bed and stirred-tank batch culture of CHO cells, *Biotech. Bioeng.*, 60, 5:596-607.
- Goochee C.F., Gramer M.J., Andersen D.C., Bahr J.B., y Rasmussen J.R. (1991), The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties, *Biotechnology (N.Y.)*, 9, 12:1347-1355.
- 50 Goochee C.F., y Monica T. (1990), Environmental effects on protein glycosylation, *Biotechnology (N.Y.)*, 8, 5:421-427.
- 55 Grantham et al. (1974), Amino acid difference formula to help explain protein evolution, *Science*, vol. 185, pp. 862-864.
- Harvey (2001), Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry, *Proteomics*, 1, 311-238.

- 5 Hayter P.M., Curling E.M.A., Gould M.L., Baines A.J., Jenkins N., Salmon I., Strange P.G., y Bull A.T. (1993), The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon-gamma production in glucoselimited chemostat culture, *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 9:1077-1085.
- Hermentin P., Witzel R., Kanzy E.J., Diderrich G., Hoffmann D., Metzner H., Vorlop J., Haupt H., The hypothetical N-glycan charge: a number that characterizes protein glycosylation, *Glycobiology*, marzo de 1996, 6(2):217-230.
- 10 Hooker A.D., Goldman M.H., Markham N., James D.C., Ison A.P., Bull A.T., Strange P.G., Salmon I., Baines A.J., y Jenkins N. (1995), N-Glycans of recombinant human interferon-g change during batch culture of chinese hamster ovary cells, *Biotech. Bioeng.*, 48:639-648.
- Hu W.-S., y Aunins J.G. (1997), Large-scale mammalian cell culture, *Current Opinion in Biotechnology*, 8:148-153.
- 15 Jenkins N., Parekh R.B, y James D.C. (1996), Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry, *Nature Biotechnology*, 14:975-981.
- Kadouri A., y Spier R.E. (1997), Some myths and messages concerning the batch and continuous culture of animal cells, *Cytotechnology*, 24:89-98.
- 20 Kim S.H., Eisenstein M., Reznikov L., Fantuzzi G., Novick D., Rubinstein M., Dinarello C.A., Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97:1190-1195.
- 25 Kyung Yun-Seung, Peshwa Madhusudan V., Gryte David M., y Hu Wei-Shou (1994), High density culture of mammalian cells with dynamic perfusion based on on-line oxygen uptake rate measurements, *Cytotechnology*, 14:183-190.
- 30 Novick D., Kim S.-H., Fantuzzi G., Reznikov L., Dinarello C., y Rubinstein M. (1999), *Immunity*, 10, 127-136.
- Oh D.J., Choi S.K., y Chang H.N. (1994), High-density continuous cultures of hybridoma cells in a depth filter perfusion system, *Biotechnology and Bioengineering*, 44:895-901.
- 35 Pearson (1990), Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA, *Methods Enzymol.*, 1990, 183:63-98.
- Puren et al. (1999), Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1 beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(5):2256-2261.
- 40 Racher A.J., y Griffiths J.B. (1993), Investigation of parameters affecting a fixed bed bioreactor process for recombinant cell lines, *Cytotechnology*, 13:125-131.
- 45 Racher A.J., Looby D., y Griffiths J.B. (1993), Influence of ammonium ion and glucose on mAb production in suspension and fixed bed hybridoma cultures, *Journal of Biotechnology*, 29:145-156.
- Sugiura T., y Kakuzaki M. (1998), Dynamics of recombinant protein production by mammalian cells in immobilized perfusion culture, *Enzyme and Microbial Technology*, 22:699-704.
- 50 Vigers et al., *Nature*, marzo de 1997, 13, 386(6621):190-194.
- Wang M.-D., Yang M., y Butler M. (2002), Erythropoietin production from CHO cells grown by continuous culture in a fluidized-bed bioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 2:194-203.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un proceso para producir una proteína de unión a interleuquina-18 (IL-18BP) recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO) en un biorreactor en condiciones de cultivo sin suero, en el que el proceso es un proceso discontinuo que comprende las etapas de:
- 5 a) una fase de propagación celular a 37 °C;
b) opcionalmente, una fase intermedia a 33 °C;
c) una fase de producción a 29 °C.
- 2.- El proceso según la reivindicación 1, en el que.
- 10 3.- El proceso según la reivindicación 2, en el que la densidad celular total en la fase de producción varía entre 4 a 8 x 10⁶ células por ml por día a lo largo de al menos 10 días de cultivo celular.
- 4.- El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la viabilidad varía entre 100% y 80%.
- 5.- El proceso según la reivindicación 4, en el que la viabilidad varía entre 100% y 80% a lo largo de al menos 10 días de cultivo celular.
- 15 6.- El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la productividad de proteínas es mayor que aproximadamente 150 mg o aproximadamente 350 mg por l por día.
- 7.- El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la etapa de recolectar el sobrenadante del cultivo celular.
- 8.- El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además la etapa de purificar la IL-18BP.
- 20 9.- El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además la etapa de formular la IL-18BP en una composición farmacéutica.

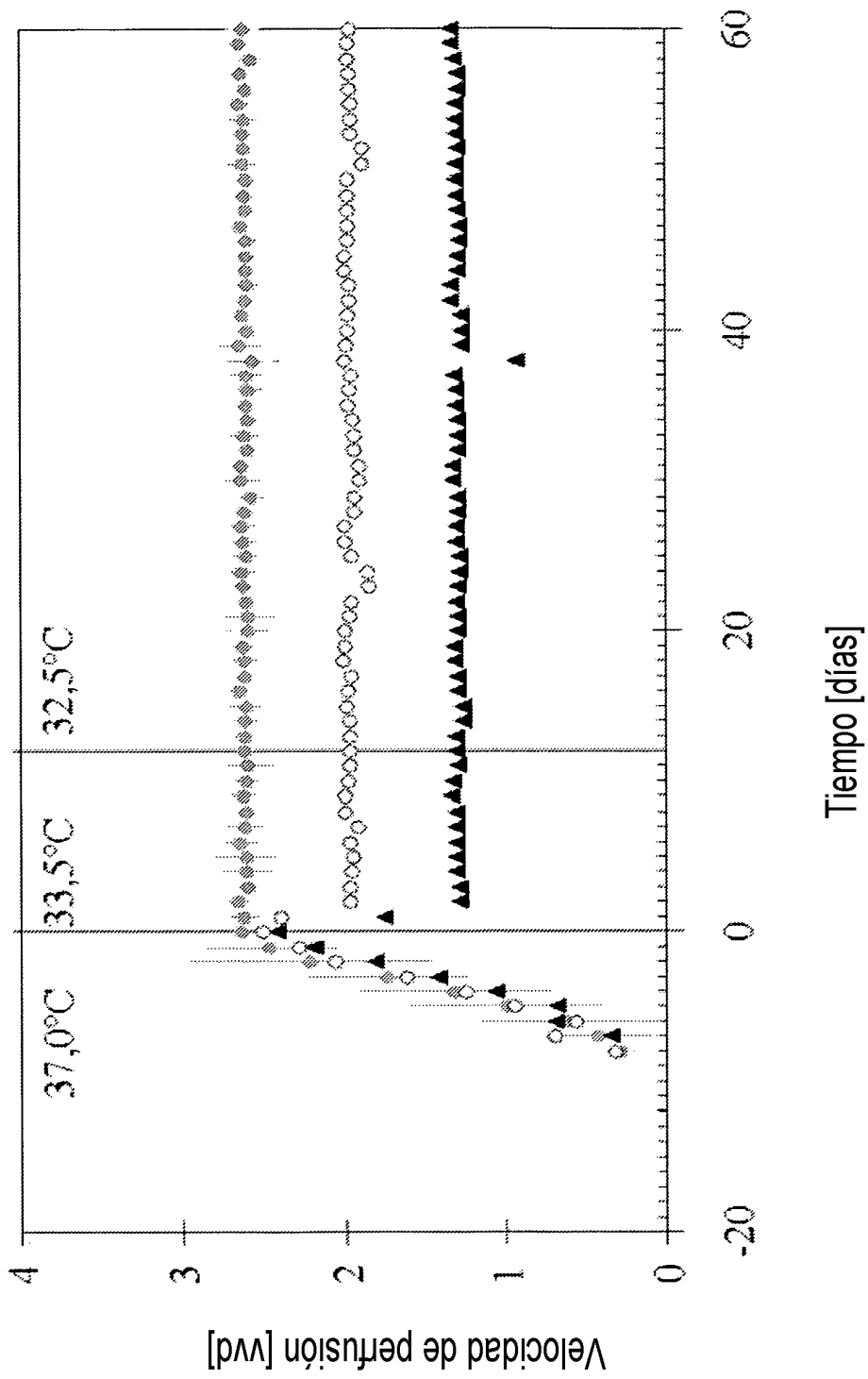


Fig. 1

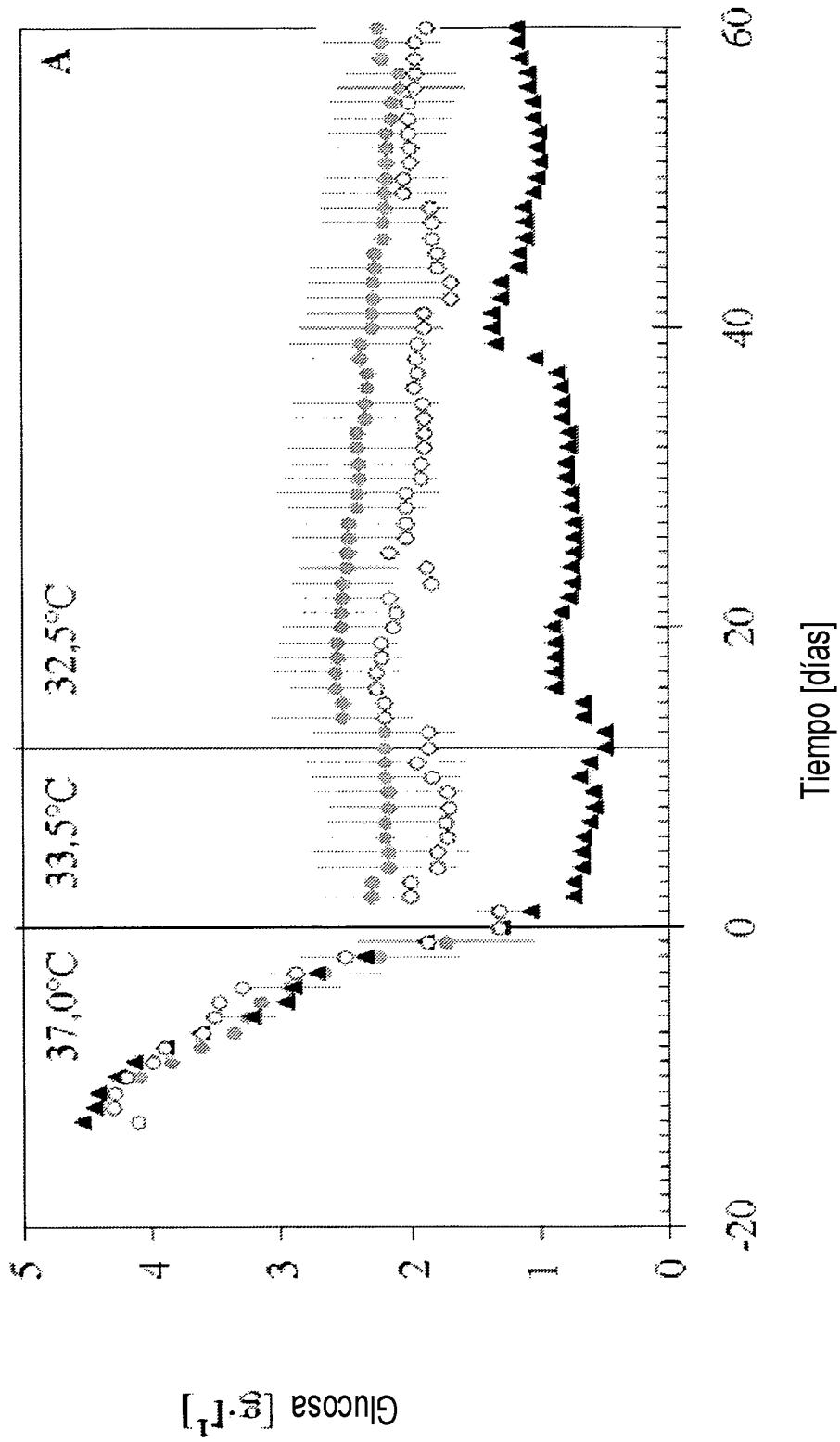


Fig. 2A

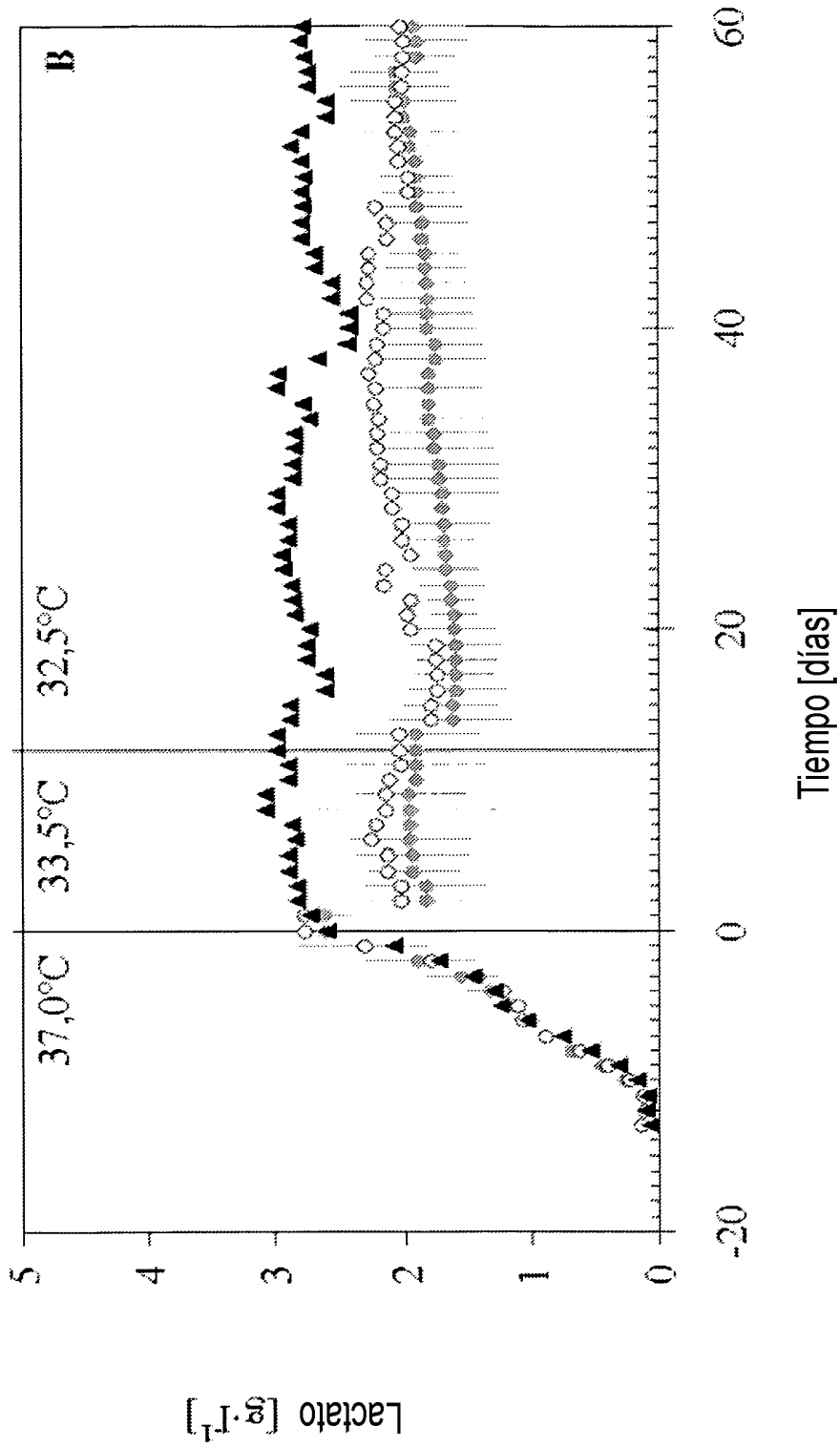


Fig. 2B

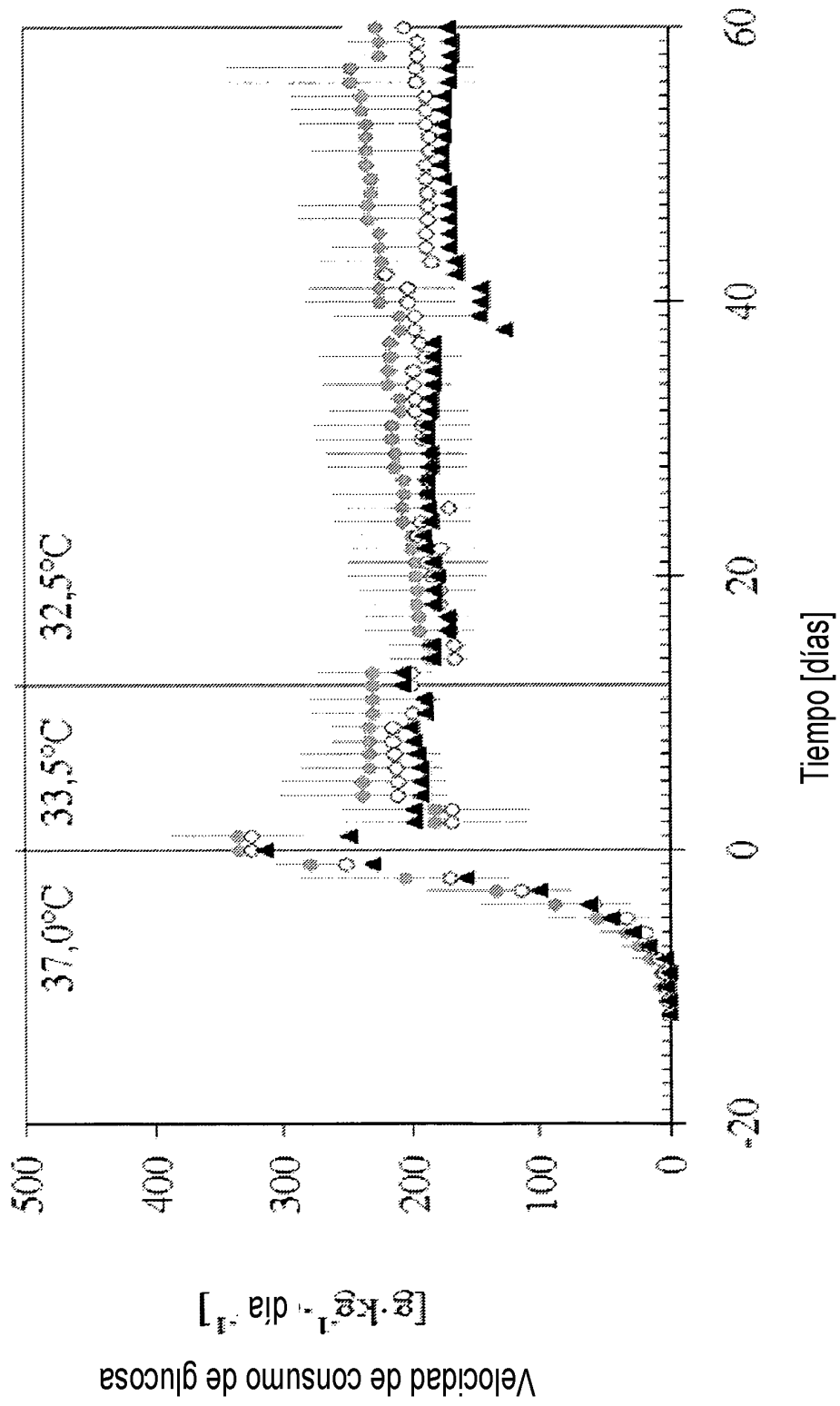


Fig. 3

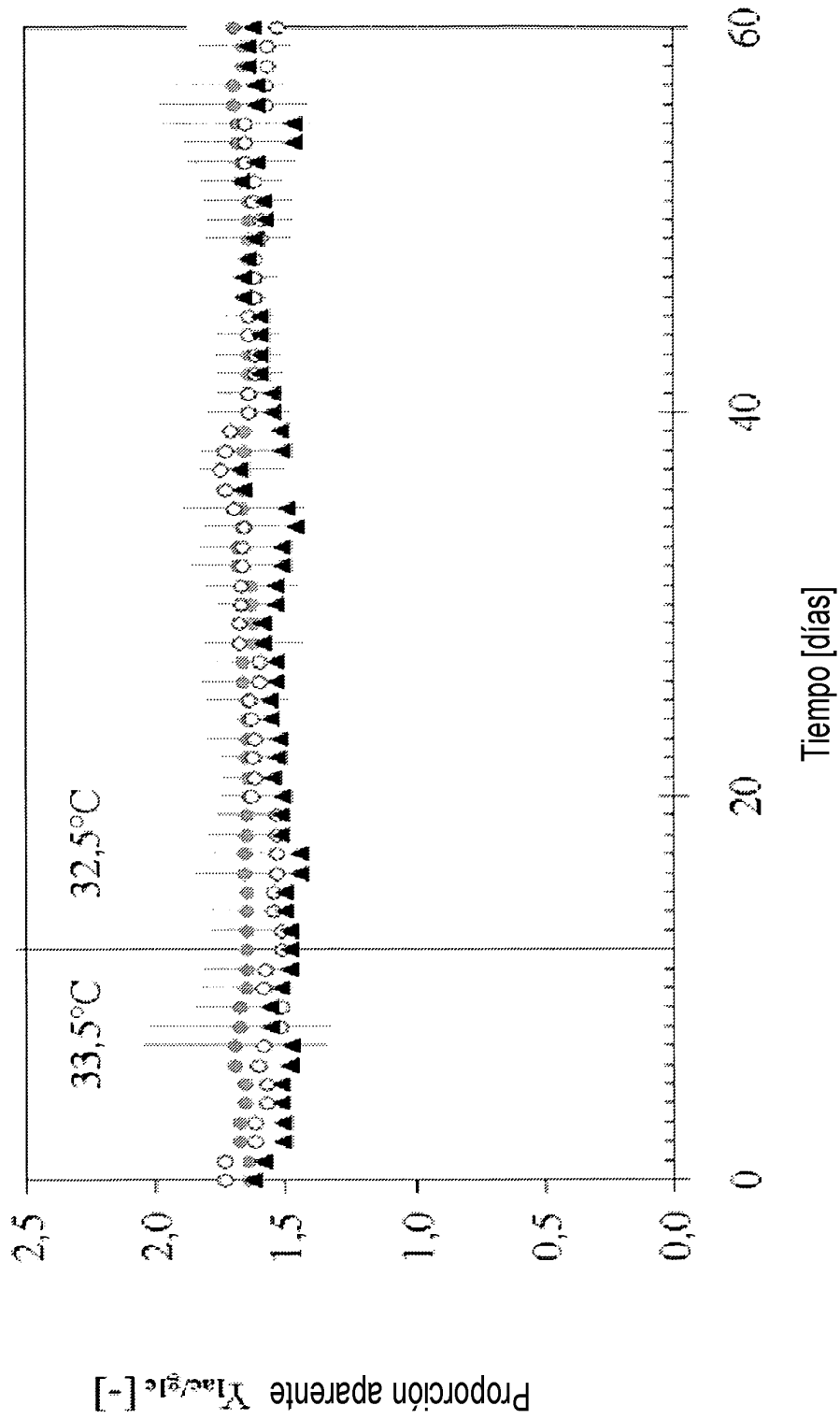


Fig. 4

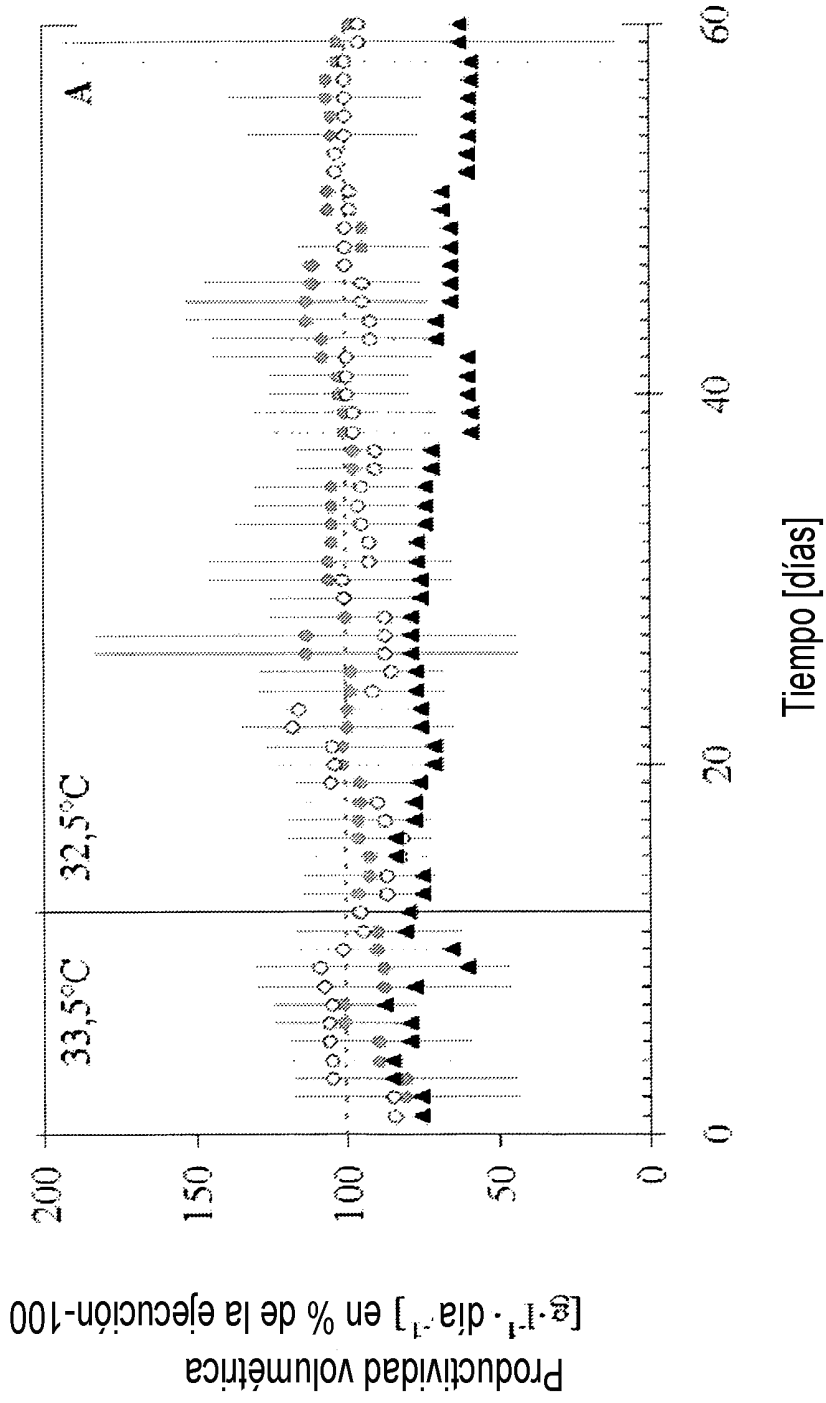


Fig. 5A

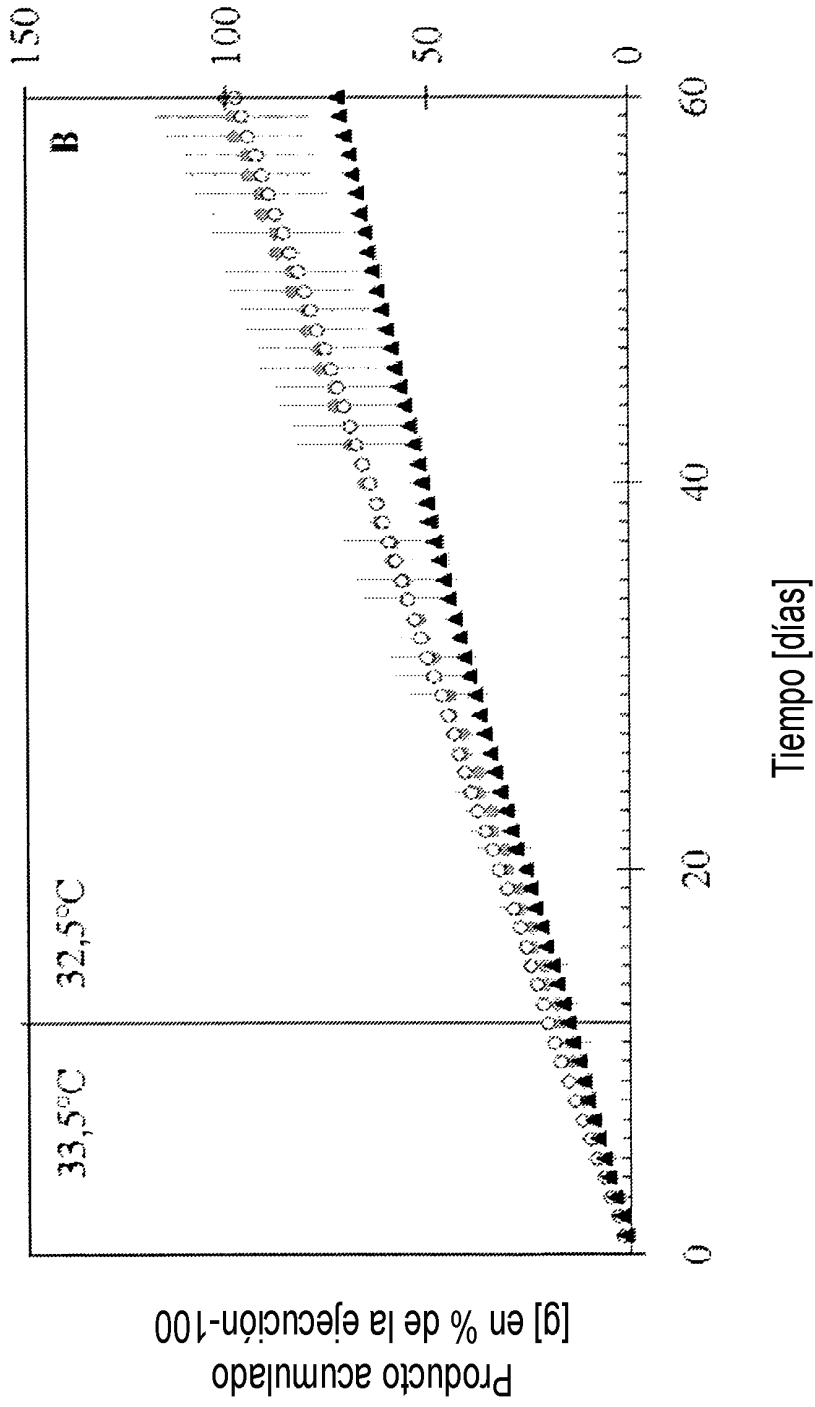


Fig. 5B

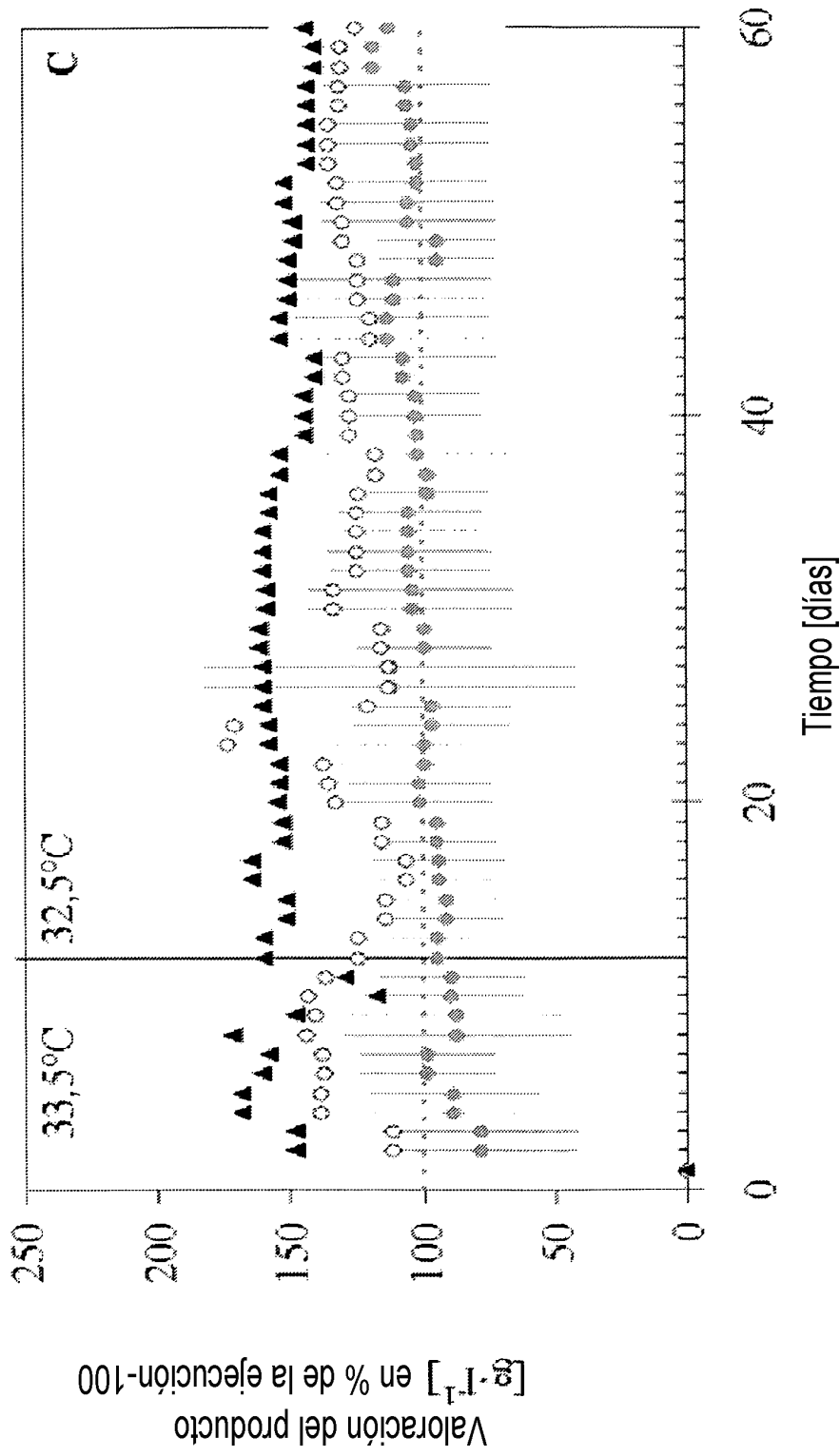


Fig. 5C

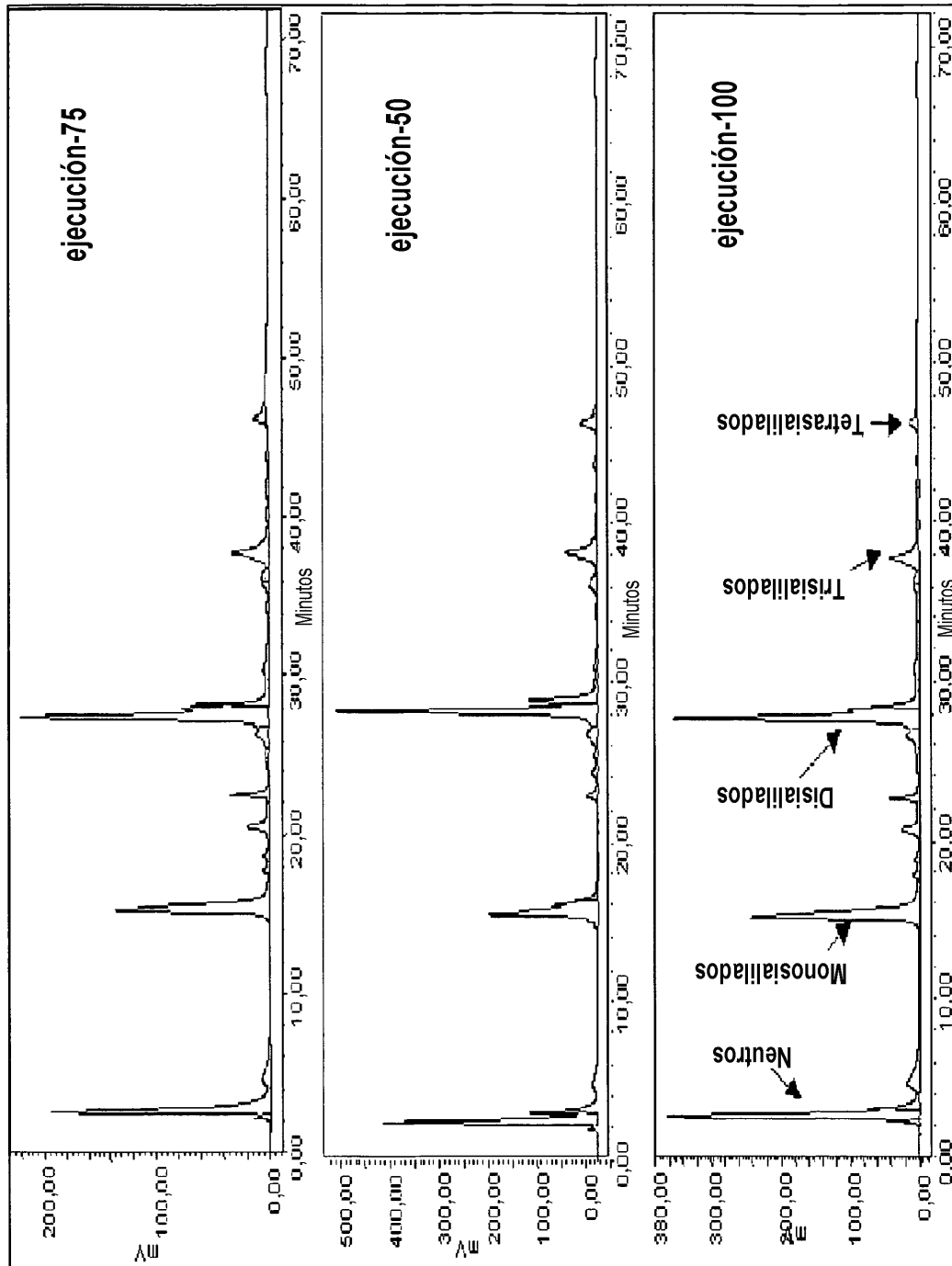


Fig. 6

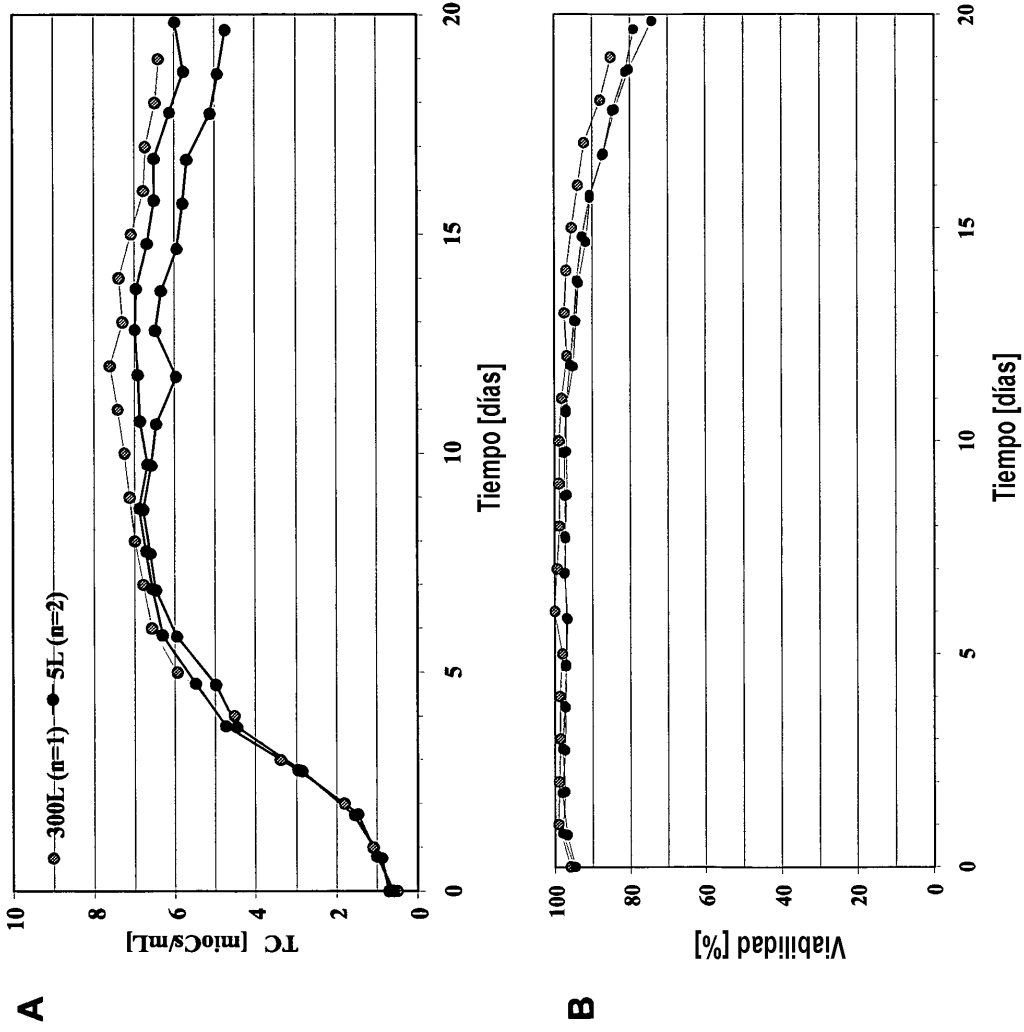


Fig. 7

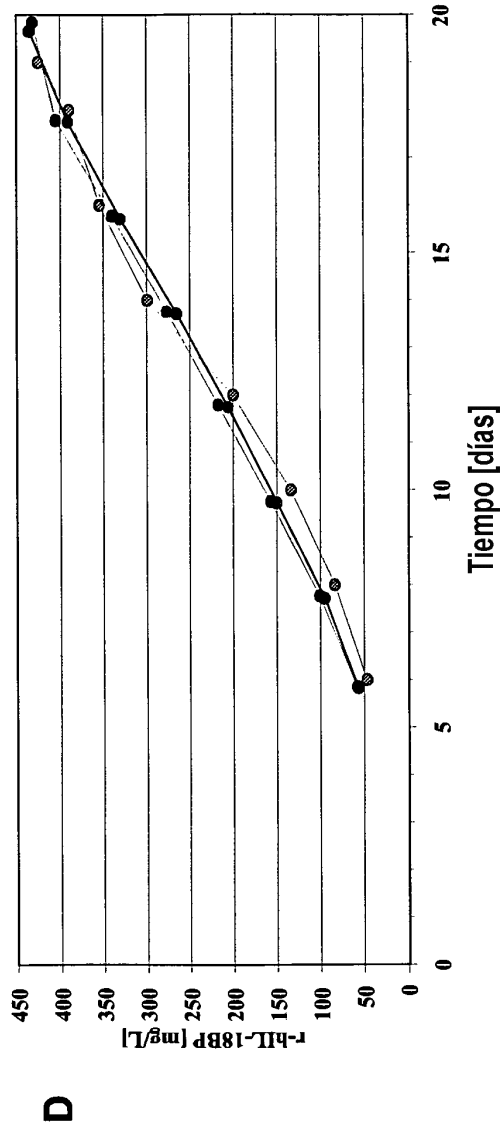
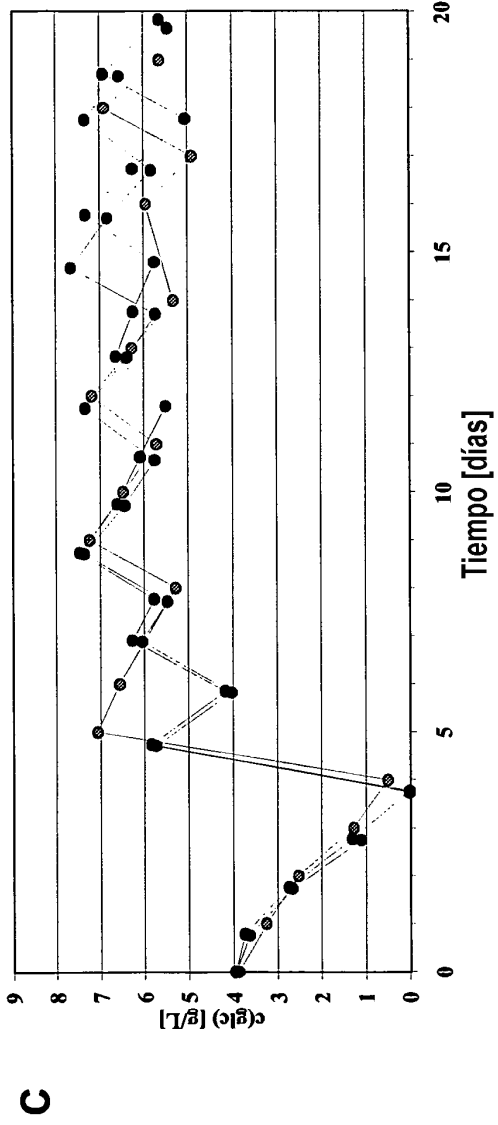


Fig. 7 cont.

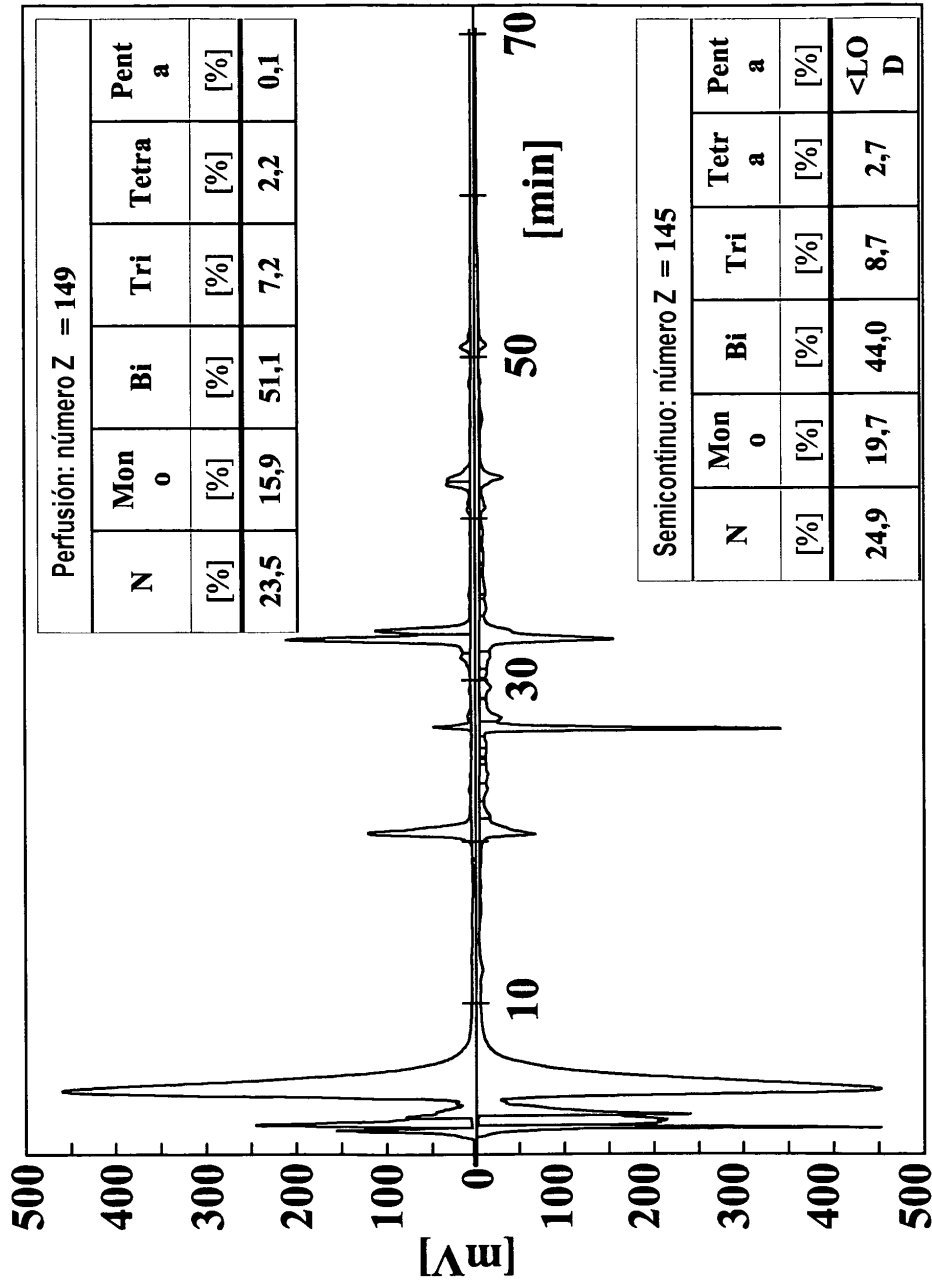


Fig. 8

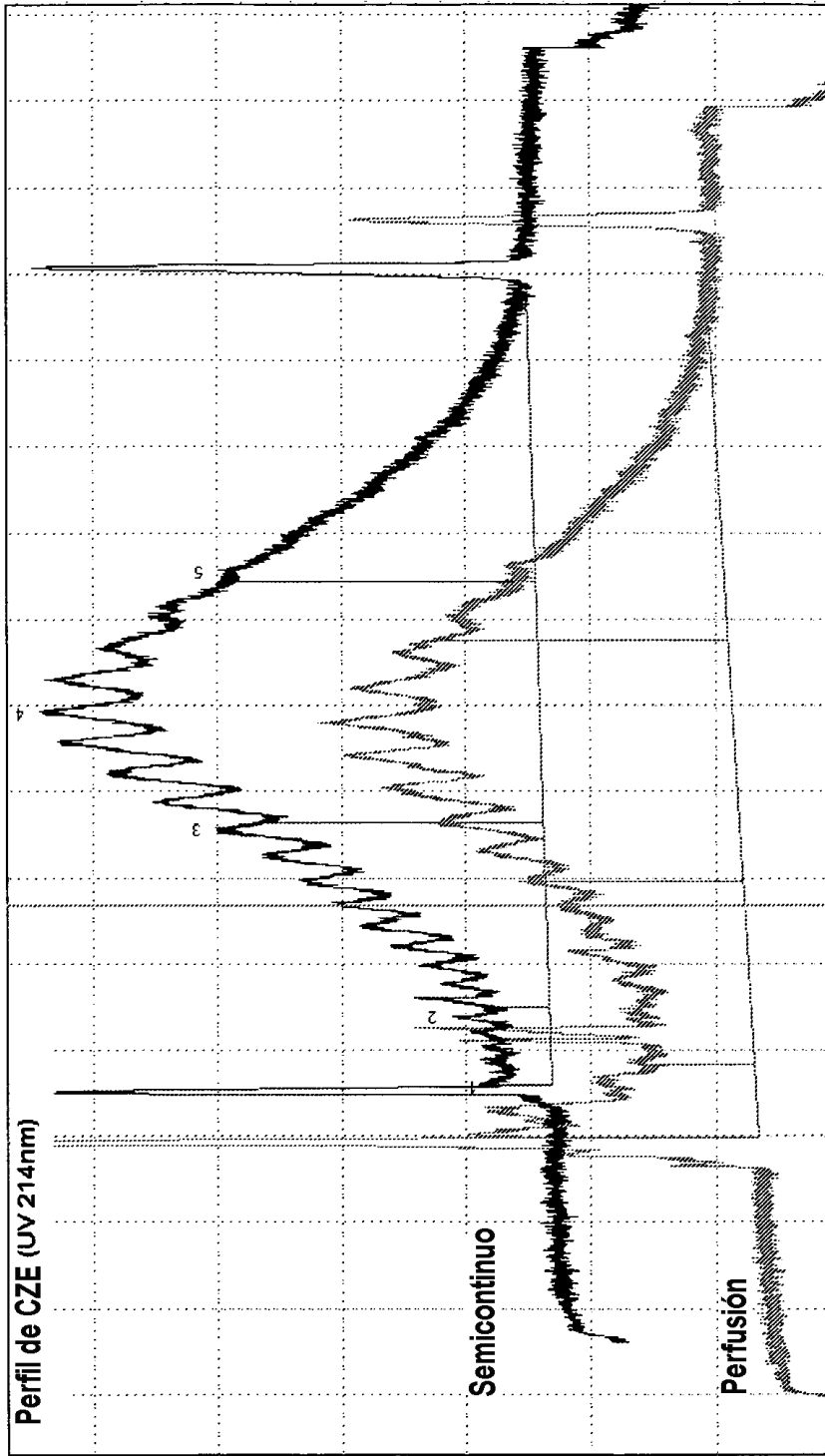


Fig. 9

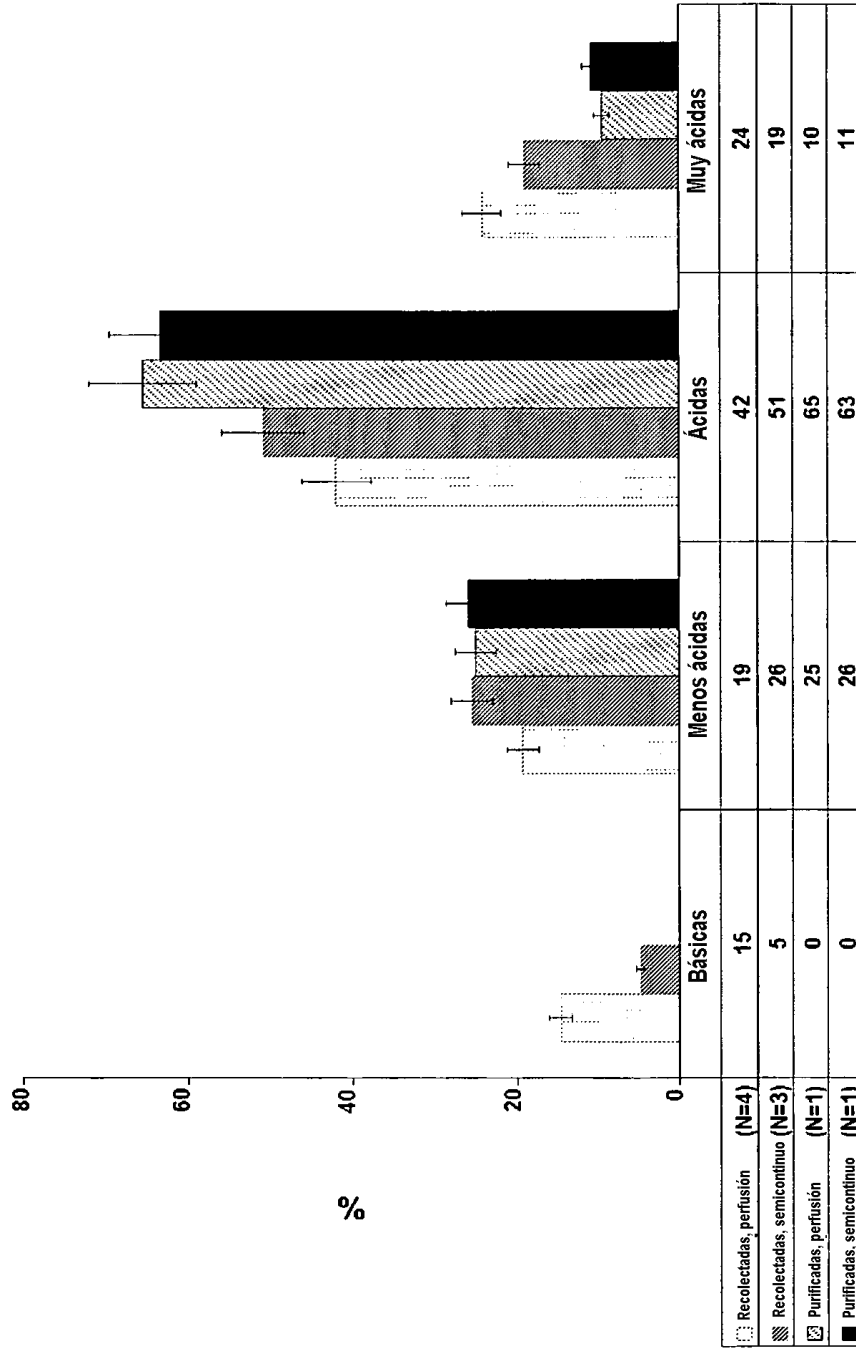


Fig. 10