

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 389**

51 Int. Cl.:

C12P 21/04 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2009 E 09743225 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2276850**

54 Título: **Procedimiento modificado de fabricación de IRX-2**

30 Prioridad:

14.04.2008 US 44674

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

20.11.2013

73 Titular/es:

**IRX THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
140 West 57th Street Suite 9C
New York, NY 10019, US**

72 Inventor/es:

**FENNINGTON, GEORGE J. y
BRANDWEIN, HARVEY J.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 430 389 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

Procedimiento modificado de fabricación de IRX-2.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método de producción de cantidades grandes de compuestos biológicos. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación aumentado proporcionalmente, de un compuesto biológico derivado de células primarias.

Antecedentes de la invención

Descripción de la técnica relacionada

10 Existen diversos métodos en la técnica utilizados para producir compuestos biológicos a partir de células, que, generalmente, implican las etapas de estimular células por incubación y lavado de las mismas para obtener el producto deseado.

15 Por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 4.390.623 concedida a Fabricius, describe una preparación de factor de crecimiento de células T (interleuquina-2), exenta de suero y desprovista de mitógenos, obtenida a partir de células mononucleares de sangre periférica humana, bovina o porcina que son lavadas varias veces con un medio líquido de cultivo de tejidos, y estimuladas después en un medio de cultivo de tejidos suplementado con suero y un mitógeno. Las células estimuladas separadas se lavan otra vez con medio de cultivo de tejidos de nueva aportación para separar sustancialmente la totalidad del suero y del mitógeno. Las células lavadas son suspendidas en medio de cultivo de tejidos de nueva aportación y acondicionadas en condiciones de incubación para transferir el factor de crecimiento al líquido. El medio de cultivo de tejidos separado de las células estimuladas, puede reciclarse para estimular más células. El sobrenadante puede concentrarse de 50 a 100 veces sobre un ultrafiltro.

20 La patente de EE.UU. No. 4.406.830 concedida a Fabricius, describe un procedimiento de producción de interleuquina-1 (IL-1)(conocida también como factor de activación de linfocitos, LAF), exenta de suero y libre de mitógenos, y de IL-2 exenta de suero y libre de mitógenos, por incubación de células mononucleares de sangre periférica (PBL) en un medio líquido de cultivo de tejidos exento de suero, para separar proteínas séricas residuales existentes sobre las superficies de las células PBL, activación de las células incubadas con un mitógeno, lavado de las células activadas con un líquido estéril para separar el mitógeno de las células y acondicionamiento de las células activadas exentas de suero y libre de mitógeno en un medio líquido de cultivo de tejidos para producir una interleuquina-1 (iL-1) exenta de suero y libre de mitógeno, poniendo en contacto el medio líquido de cultivo de tejidos que contiene IL-1 con nueva glicoproteína sérica sanguínea, e incubación de las células en presencia de iL-1 y de la nueva glicoproteína sérica sanguínea para inducir la síntesis de IL-2, y transferir la IL-2 (factor de crecimiento de células T) desde las células a la fase líquida del medio de cultivo de tejidos, produciendo con ello una IL-2 exenta de suero y libre de mitógeno..

25 La patente de EE.UU. No. 5.503.828, concedida a Testa, describe un método de producción de cantidades grandes de interferón-alfa por inducción y purificación. Se obtiene una mezcla de subtipos de interferón-alfa producida a partir de leucocitos de sangre periférica., mediante: (a) preparación de leucocitos de sangre periférica humana recogiendo capas anteadas y lisando hematíes con cloruro amónico, (b) suspensión de leucocitos con una densidad celular de $1-10 \times 10^6$ células/ml en un medio de inducción que comprende MEM de Eagle que contiene sales de Eagle, L-glutamina, aminoácidos no esenciales, Tricine, 4,46 mg/ml, pH 7,4, sulfato de neomicina, 24 µg/ml, vitaminas B3 y C, bicarbonato sódico, y entre 0,1 a 1,5 mg/ml de suero agamma humano, (c) adición de interferón-alfa, crudo o purificado, como cebador, a los leucocitos suspendidos en el medio de inducción; (d) incubación de la suspensión durante un período de tiempo suficiente a aproximadamente 36 grados C al tiempo que se agita a 100-300 rpm; (e) adición a la suspensión de entre 50-500 unidades de hemaglutinina por ml de virus Sendai; (f) incubación durante un período de tiempo suficiente a aproximadamente 36 grados C al tiempo que se agita a 100-300 rpm; (h) centrifugación a aproximadamente 2.500 rpm para separar células y productos de desecho; e (i) recogida del interferón-alfa crudo obtenido como producto, sin separación de un subtipo de interferón-alfa de los otros subtipos de interferón-alfa presentes en la mezcla de alfa.

30 La patente de EE.UU. No. 6.350.589, concedida a Morris, describe un método de producción de interferones de tipo 1, multisubtipos. El método incluye las etapas de (a) cultivar leucocitos; (b) estimular los leucocitos para producir un interferón crudo; (c) concentrar el interferón crudo para separar contaminantes de bajo peso molecular; (d) reducir el volumen de líquido para producir un interferón crudo concentrado; (e) retirar una cantidad sustancial de albúmina sérica y otros contaminantes, del interferón crudo concentrado para producir una mezcla de interferones parcialmente purificada que contiene una pluralidad de subtipos; (f) separar sustancialmente la totalidad de la albúmina sérica restante y otros contaminantes de la mezcla de interferones parcialmente purificada para generar una mezcla de interferones que tiene una pureza de entre aproximadamente 50% y aproximadamente 80%; y (g) purificar la mezcla de interferones de aproximadamente 50% a 80% aproximadamente para producir una mezcla altamente purificada de interferón de Tipo I que tiene una pureza de al menos aproximadamente 95% y que contiene no más que aproximadamente 35% en peso de los subtipos IFN alfa-2 e INF alfa-8.

La patente de EE.UU. No. 6.896.879 concedida a Talor, describe un método de producción de una mezcla de citoquinas que está exenta de suero, libre de mitógeno y desprovista de antibióticos. En el procedimiento de fabricación, se separan células mononucleares procedentes de “capas anteadas” de donantes humanos por centrifugación con gradiente escalonado y se cultivan con fitohemaglutinina (PHA) para intensificar la producción y secreción de IL-2 y otras citoquinas de los glóbulos blancos del donante en cultivo. Seguidamente, el sobrenadante del cultivo se recolecta asépticamente, se clarifica y se somete a un proceso comercial de exclusión de virus. Después el sobrenadante se concentra aproximadamente 10 veces mediante ultrafiltración y microfiltración. En este punto, se añade Albúmina de Suero Humana, Inyección de la Farmacopea de Estados Unidos, y el concentrado se tampona entonces a un pH fisiológico y se lleva a una concentración diana de IL-2 según la indicación de la etiqueta (por ejemplo, 400 UI/ml). El concentrado se somete después a una segunda microfiltración (filtro de 0,22 micrómetros) y se distribuye asépticamente en viales estériles del tipo de los del suero, y se etiquetan según su contenido de IL-2. La potencia del producto se mide mediante la incorporación de timidina radiomarcada por una línea linfoide-T citotóxica (CTLL-2). El agente inyectable final se somete después a ensayo ELISA para determinar la presencia de cinco citoquinas marcadoras: IL-2, IL-10, GM-CSF, IFN- γ y TNF- α .

Las patentes de EE.UU. Nos. 5.632.983, 5-698.194, 6.977.072, 7.153.499 y 7.182.942, concedidas a Hadden, describen un método de producción de una mezcla natural de citoquinas (NCM) que es una mezcla única de citoquinas de IL-1 β , IL-2, IL-8, INF- γ , y TNF- α . Se recogen glóbulos blancos de capa antea de sangre humana procedente de varios donantes negativos respecto a virus de hepatitis, y negativos respecto al HIV,. Las células de los donantes se agrupan y se distribuyen en capas sobre gradientes de ficoll hypaque (Pharmacia), obteniendo linfocitos libres de neutrófilos y eritrocitos. En una realización preferida para la producción de NCM se lavan linfocitos y se distribuyen en medio X vivo-10 (Whitaker Bioproducts) en frascos. (MicroCELLector TM. T25 Cell Culture Flasks) en los que están estimulantes inmovilizados, es decir, mitógenos. El procedimiento de inmovilización para los estimulantes se realiza según está descrito por el fabricante, para inmovilizar diversas sustancias para llevar a cabo procesos operatorios de separación en placas, es decir separación de células, en los frascos. Las células se incuban se incuban durante 24-48 horas en medio X vivo-10 con ciprofloxacina, (Miles Lab), 80 μ g/ml, a 37°C en un incubador de CO2/aire. Después de incubar los sobrenadantes se vierten totalmente y se recogen. Puede añadirse Albúmina de Suero Humana (HSA) para estabilizar las interleuquinas. Generalmente, la HSA se emplea en una concentración de 0,1 a 0,5% (peso en volumen). Los sobrenadantes se mantienen a una temperatura de 4°C a -70°C. Los sobrenadantes reunidos se caracterizan midiendo el contenido de citoquinas mediante bioensayo para IL-2 y ensayos ELISA para una o más de las interleuquinas IL-1, IL-15, CSFs, TNFs e IFNs. La esterilidad se ensaya por cultivo en caldo de tioglicolato y medida de endotoxinas por ensayo de lisado de límulus, según se conoce en la técnica. Cada sobrenadante es normalizado o bien por concentración o bien por cantidad administrada, para que puedan llevarse cabo las comparaciones.. En particular, se utiliza la equivalencia de IL-2 para cada sobrenadante. La exclusión de DNA y de virus, si se usa, emplea técnicas tales como ultrafiltración, fraccionamiento en etanol, precipitación con polietilenglicol/bentonita, y/o tratamiento con disolvente /detergente como ha sido utilizado para la gamma-globulina intravenosa (folleto de IGIV News Update). Puede utilizarse inactivación fotoquímica, ftalocianina aluminica, o irradiación gamma. Este procedimiento se discute adicionalmente en la presente invención, más adelante.

Existen varias limitaciones de los procedimientos manuales utilizados para producir compuestos biológicos tales como la sensibilidad del operador, el potencial de contaminación de un sistema abierto, proporciones inconsistentes y niveles totales de proteínas inconsistentes del producto final todas las cuales hacen que el producto obtenido sea inadecuado para obtener preparados de calidad farmacéutica. Para tratar de resolver estos problemas en el pasado, se han llevado a cabo procedimientos operatorios engorrosos tales como el empleo de filtros, almidón, centrifugaciones manuales, y lavados. Los procedimientos anteriores eran procedimientos operatorios a pequeña escala, que daban lugar a lotes inconsistentes y a pequeñas cantidades de producto.

Otra etapa del tratamiento de compuestos biológicos que debe ser tomada en consideración, es la separación de virus. La seguridad del paciente es primordial y en procedimientos de biotecnología existe el riesgo de que virus adventicios contaminen las células incorporadas al proceso, Por consiguiente, se investigan etapas de inactivación y separación para eliminar virus que pueden estar, o no estar, presentes. Varios logs de limpieza/inactivación son requeridos por especificaciones de la FDA y de ICH. Las agencias reguladoras sugieren el ensayo de la masa sin tratar para determinar la presencia de virus potenciales así como para incluir en el procedimiento métodos que proporcionen un mínimo de 4 log 10 de inactivación/separación de virus para ser considerado significativo. Se sugiere que los métodos incluyan dos (o más) etapas ortogonales dirigidas preferiblemente hacia virus sin cubierta como diana. La especificación reguladora sugiere que deben llevarse a cabo estudios de validación para caracterizar la capacidad de los métodos de producción para separar/inactivar virus adventicios que presentan una gama de propiedades bioquímicas o biofísicas, para caracterizar la robustez del procedimiento.

Para la producción de compuestos biológicos derivados de células primarias, leucocitos de donantes, células fuente para producir citoquinas, son clasificados por los centros de sangre para detectar la presencia de ácido nucleico viral por PCR (NHCV y NHIV) y de antígenos virales tradicionales (virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de la hepatitis C (HCV) y de la hepatitis B (HBV) y virus linfotrópico-T humano (HTLV). Sin embargo otros virus , Epstein Barr (EBV), Citomegalovirus (CMV) y Parvovirus Humano B-19 (B-19) pueden estar presentes, todavía, en donantes cualificados y ser utilizados para la producción. Niveles detectables de EBV podrían estar presentes en

hasta el 100% de donantes sanos (Walling et al., 2003). Niveles de B-19 mayores de 1012 por ml, han sido indicados en individuos asintomáticos (Doyle y Corcoran, 2006). y resultados de infección en un período breve de viraemia con títulos tan altos como 1014 por ml (Anderson, 1875). Debido al lavado extenso de las células empleado en el procedimiento de obtención de compuestos biológicos derivados de células primarias, la mayor parte de los virus asociados al plasma son separados, esencialmente, de los leucocitos de los donantes, y cualquier virus detectado en la masa de los compuestos biológicos derivados de células primarias, antes de las etapas aguas abajo de separación/inactivación serían solamente los separados de células infectadas.

No obstante, se necesitan procedimientos robustos de inactivación/separación para certificar la seguridad de los productos obtenidos. El procedimiento manual conocido de producción de compuestos biológico derivados de células primarias, implica un trabajo intenso y no puede aumentarse proporcionalmente con facilidad, se limita a volúmenes de fluido estéril que podrían obtenerse por un procedimiento manual. Por consiguiente, se busca el desarrollo de procedimientos para reducir las manipulaciones manuales y conseguir de modo práctico su comercialización.

Compendio breve de la invención

15 Un método conocido de fabricación y purificación de un compuesto biológico derivado de células primarias, que contiene las citoquinas IL-1 β , IL-2 e IFN- γ , incluye las etapas de:

(a) separar células contaminadas procedentes de células mononucleares (MNCs), que son leucocitos, cargando los leucocitos en un medio de separación de linfocitos (LSM) y lavando y centrifugando el medio;

(b) almacenar las MNCs purificadas;

20 (c) estimular las MNCs purificadas con un mitógeno y ciprofloxacina en un sistema de cultivo celular desechable, para producir citoquinas;

(d) separar el mitógeno de las MNCs;

(e) incubar las MNCs en un medio de cultivo;

(f) separar las MNCs del medio de cultivo, produciendo con ello un sobrenadante;

25 (g) separar DNA desde el sobrenadante mediante cromatografía de intercambio aniónico; y

(h) separar virus desde el sobrenadante cromatografiado que resulta.

Según la presente invención, la etapa (a) se lleva a cabo con un sistema automatizado de tratamiento y lavado de células; la etapa (b) se realiza durante la noche en un sistema de bolsa estéril cerrada; la etapa (f) se realiza mediante filtración; y la etapa (h) se lleva a cabo por filtración con filtros dobles de 15 nanómetros, en serie. Estas mejoras permiten llevar a cabo todas las etapas en un sistema automatizado, como se explica en la descripción que sigue.

Una separación viral adicional puede realizarse también empleando luz ultravioleta-C (UVC), conforme se describe con mayor detalle en la descripción que sigue.

Según se ha indicado, el método conforme a la presente invención puede llevarse a cabo en un método automatizado, en un procesador de células automatizado, con lavado, centrifugación de las células y obtención de células purificadas, siendo todo ello automático.

Características de la presente invención serán descritas en la descripción que sigue con referencia a los dibujos que se acompañan, en los que:

40 La FIG. 1 es una fotografía del perfil de citoquinas del compuesto biológico derivado de células primarias (conocido) que se utilizó en ensayos clínicos de Fase II;

la FIG. 2 es una carta que compara el procedimiento manual frente al procedimiento comercial de obtención de compuestos biológicos derivados de células primarias, de la presente invención.

la FIG. 3 es una gráfica del análisis de la población de células de MNCs purificadas por el procesador de células, frente a Ac-T diff2;

45 la FIG. 4 es una fotografía del perfil de citoquinas del compuesto biológico derivado de células primarias que se obtuvo (según la invención) en un procedimiento realizado a escala comercial;

la FIG. 5 es una gráfica de un ensayo DTH específico de péptidos de un producto obtenido según la invención (procedimiento modificado) en comparación con uno producido por el procedimiento conocido (estándar);

la FIG. 6 es una fotografía de una Análisis de Transferencia Western del compuesto biológico derivado de células primarias, obtenido según la invención, después de UVC; y

la FIG. 7 es una fotografía de una colección de citoquinas del compuesto biológico derivado de células primarias, obtenido según la invención, antes y después de UVC.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona, en general, un método de fabricación de cantidades grandes de un compuesto biológico derivado de células primarias, preferiblemente IRX-2, para una producción comercial. El método hace un uso nuevo de diversas etapas del procedimiento que pueden realizarse a escala para obtener la cantidad deseada de producto. Se purifican células mononucleares (MNCs) para separar las células contaminantes cargando leucocitos en un medio de separación de linfocitos (LSM) y sometiendo a centrifugación el medio para obtener MNCs purificadas, empleando un sistema automatizado de tratamiento y lavado de células. Las MNCs se guardan luego durante la noche en una bolsa de FEP para el almacenamiento de linfocitos. Se estimula una mezcla de inducción de las MNCs con un mitógeno, preferiblemente fitohemaglutinina (PHA) y ciprofloxacina en un dispositivo de cultivo de células desechable, y se produce desde las MNCs un compuesto biológico derivado de células primarias. Se separa el mitógeno de la mezcla de inducción por filtración y modo de filtración de flujo tangencial (TFF), y después se incuba la mezcla de inducción. La mezcla de inducción se clarifica por filtración obteniendo un sobrenadante biológico derivado de células primarias. Finalmente, se separan del sobrenadante biológico derivado de células primarias DNA y agentes adventicios mediante aplicación de cromatografía de intercambio aniónico y filtración por filtro de 15 nanómetros y, opcionalmente, inactivación posterior por luz ultravioleta-C (UVC). Después, el producto final puede distribuirse en viales y almacenarse para su administración futura a un paciente.

Un "compuesto biológico derivado de células primarias", como se emplea en esta memoria, es un conjunto de citoquinas, preferiblemente citoquinas naturales y no recombinantes, conocido también anteriormente como una NCM (mezcla de citoquinas naturales). Preferiblemente, el compuesto biológico derivado de células primarias es el IRX-2 según se describe más adelante, y las dos expresiones pueden emplearse indistintamente en toda esta solicitud de patente sin apartarse del significado pretendido.

"IRX-2" es un compuesto biológico derivado de células primarias, natural, que deriva de leucocitos, producido por glóbulos blancos humanos (células mononucleares) purificados, estimulados por fitohemaglutinina (PHA) y ciprofloxacina (CIPRO). Los componentes activos principales son la interleuquina 1 β (IL-1 β), la interleuquina 2 (IL-2) y el interferón- γ (IFN- γ). Al IRX-2 se ha aludido anteriormente también como una "NCM", una mezcla natural de citoquinas, definida y expuesta en las patentes de EE.UU. Nos. 6.977.072 y 7.153.499. Brevemente, el compuesto IRX-2 se prepara en la presencia continua de un antibiótico de 4-aminoquinolona y con la presencia continua o pulsada de un mitógeno, que en la realización preferida es PHA. Sin embargo, pueden utilizarse también otros mitógenos. Según una realización preferida de la invención, el compuesto IRX-2 contiene una concentración de IL-1 β que varía de 80 a 6.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 150 a 1.800 pcg/ml; una concentración de IL-2 que varía de 600 a 60.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 3.000 a 12.000 pcg/ml, y una concentración de IFN- γ que varía de 200 a 20.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 1.000 a 4.000 pcg/ml.

El IRX-2 puede contener también una concentración de IL-6 que varía de 60 a 6.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 300 a 2.000 pcg/ml; una concentración de IL-8 que varía de 6.000 a 600.000 pcg/ml, más preferiblemente de 20.000 a 180.000 pcg/ml; y una concentración de TNF- α que varía de 200 a 20.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 1.000 a 4.000 pcg/ml. Pueden utilizarse citoquinas recombinantes, naturales o pegiladas, o el IRX-2 puede incluir una mezcla de citoquinas recombinantes, naturales o pegiladas. El compuesto IRX-2 puede incluir, además, otras citoquinas recombinantes, naturales o pegiladas, tales como IL-12, GM-CSF (en una concentración que varía de 100 a 10.000 pcg/ml, más preferiblemente de 500 a 2.000 pcg/ml), y G-CSF.

Para que las células T queden activadas para destruir células neoplásicas (p.ej. células de cáncer de cabeza y cuello) deben tener lugar varias etapas. En primer lugar, un antígeno celular reconocible por una célula T, debe ser presentado a una célula T. El nódulo linfático contiene células que presentan antígeno (APCs) que llevan a cabo esta función. Las APCs son identificadas también como células dendríticas y están presentes en el estroma del nódulo linfático. Por tanto, la primera etapa es la presentación de antígeno por células dendríticas o APCs. En segundo lugar, deben desarrollarse células TH1 que sean específicas para el antígeno en cuestión. En tercer lugar, células T citotóxicas (CTL's) son "ayudadas" para reconocer y luego atacar el material celular extraño que es portador del antígeno después de movilización desde el nódulo linfático hasta el sitio de invasión. Aquellas células TH que secretan las citoquinas interleuquina-2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ), se denominan células TH1 y están asociadas con la estimulación específica de la actividad citotóxica de CTL y la inmunidad mediada por células. Otra clase de células T, designada TH2, secreta principalmente interleuquinas, 4 (IL-4), 5 (IL-5) y 10 (IL-10) y favorece la producción de anticuerpos. La "clase" predominante de citoquinas (p.ej. TH1 o TH2) producida en el comienzo de una respuesta inmunitaria, actúa "dirigiendo" el desarrollo de respuestas inmunitarias continuadas, en parte inhibiendo la producción del tipo opuesto de citoquinas. Así pues, la respuesta inmunitaria se hace "apuntada" en o bien la dirección de TH1 (mediada por células) o en la de TH2 (humoral) por la citoquina o citoquinas presentes primitivamente. Para la iniciación de una respuesta inmunitaria antitumoral robusta, es crucial, por consiguiente, disponer de citoquinas predispuestas para actuar como TH1 (p.ej. IL-2, IFN- γ) presentes durante la fase inicial de la

respuesta inmunitaria. La meta a alcanzar en la inmunoterapia del cáncer ha sido la de estimular la producción de un número suficiente de células T citotóxicas, específicas de tumores, para destruir el tumor.

5 El compuesto IRX-2 es un producto de citoquinas obtenidas bajo normas farmacéuticos estándar, partiendo de células mononucleares estimuladas por fitohemaglutinina y ciprofloxacina, procedentes de donantes de sangre sanos, normales. Este producto está destinado a ser inyectado localmente por vía subcutánea para alcanzar los nódulos linfáticos que drenan los cánceres de cabeza y cuello, para el tratamiento de los cánceres de cabeza y cuello. Este producto puede utilizarse, asimismo, par cualquier otro tipo de cáncer o de enfermedad infecciosa.

10 En el procedimiento comercial de obtención de IRX-2 la PHA, la ciprofloxacina y los elementos celulares se separan mediante centrifugación y lavado.. El sobrenadante, libre de células, se somete a tratamiento después para limpiar agentes adventicios (DNA, virus) y después es formulado, esterilizado por filtración y distribuido en viales. La interleuquina-2 es el principal componente activo de las citoquinas del IRX-2, junto con el interferón gamma (IFN- γ). ña interleuquina-1beta (IL-1 β) y el factor de la necrosis tumoral-alfa (TNF- α). Estas citoquinas intensifican la inmunidad mediada por células, principalmente como estimuladores del camino TH1. El análisis del IRX-2 revela también la presencia de otros constituyentes de tipo citoquinas en niveles bajos, pero estas citoquinas no se
15 consideran críticas para la potencia del producto.

Estos componentes actúan intensificando la inmunidad mediada por células, mediante una diversidad de actividades: reclutamiento de linfocitos (principalmente por IL-1 β), regulación al alza de receptores de crecimiento de linfocitos tales como el receptor de IL-2 (IL-2R) (principalmente por IL-1 β , IL-2, IFN- γ), intensificación de la proliferación de células T (principalmente por IL-1 β , IL-2), mantenimiento de un sesgo funcional de TH1
20 (principalmente por IFN- γ), e intensificación del procesamiento y presentación de antígenos (tumor) por células que presentan antígeno tales como macrófagos y células dendríticas (principalmente por IFN- γ) que son importantes para la activación total de células T, llevando a la destrucción de tumores. El IRX-2 favorece la diferenciación y la maduración de células dendríticas. Se necesitan células dendríticas maduras para presentar eficazmente antígeno a las células T. El IRX-2 induce también la producción de células T naturales, que son capaces de llegar a ser
25 específicas por presentación por una célula dendrítica madura que tiene expuesto antígeno. El TNF- α no se considera que es un componente activo principal desde el punto de vista clínico, pero sus niveles en IRX-2 son próximos a los anteriormente expuestos; debido a la alta labilidad del TNF- α su contenido es monitorizado como un indicador de la estabilidad del producto. La Tabla 1 que figura seguidamente, proporciona una lista de concentraciones de estas citoquinas en lotes de cGMP utilizados en ensayos clínicos de Fase I y Fase II.

30 Tabla 1. Citoquinas principales componentes de IRX-2

Descripción	IL-2 Bioensayo (UI/ml)	Citoquinas, ELISA (pg/ml)			
		IL-1 β	IL-2	IFN- γ	TNF- α
Manual	76	418.	5263	2028	1356
Manual	145	615	5797	1502	1815

Citoquinas y quimioquinas adicionales existentes en IRX-2 han sido identificadas mediante ensayos ELISA. Éstas incluyen IL-6, IL-10, IL-12, IL-8, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Los niveles de estas proteínas son mucho más bajos que las concentraciones de los componentes activos principales, excepto para IL-6 e IL-8. Estas proteínas están asociadas,
35 típicamente, con la respuesta inflamatoria y son pleiotrópicas (es decir, tienen mecanismos múltiples que dependen de las células circundantes y del medio de citoquinas) La Tabla 2 presenta una lista de estas citoquinas y sus niveles en IRX-2.

Tabla 2. Citoquinas principales componentes de IRX-2

Descripción	Citoquinas, ELISA (pg/ml)					
	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12	G-CSF	GM-CSF
Manual	1487	20.689	109	15	152	579
Manual	4127	49.180	123	4	214	578

Además del ensayo ELISA, la serie de citoquinas humanas de RAYBIO (Ray Biotech. Inc) de las 42 citoquinas más comunes, proporciona un perfil o "huella" del IRX-2. obtenido como producto. La Figura 1 expone el perfil de
40 citoquinas del IRX-2 que se utilizó en ensayos clínicos de Fase II.

El producto de citoquinas IRX-2 contrasta con la terapia anterior con citoquinas en los modos siguientes: (1) se utilizan dosis fisiológicas en vez de farmacológicas; (2) el producto se administra perilinfáticamente en vez de por vía intratumoral o intravenosa; y (3) la producción procede de leucocitos activados en vez de estar basada en

tecnología recombinante con objeto de simular niveles endógenos de citoquinas procedentes de células activadas nativas.

5 El modo de distribución toma ventaja de los caminos normales, aferente y eferente, de activación de los nódulos linfáticos. Normalmente, los nódulos linfáticos descargan desde una zona de interés, tal como un lecho de un tumor, y antígenos y otros factores asociados con las enfermedades emigran en los nódulos linfáticos hacia los nódulos regionales. En los nódulos regionales, las células que presentan antígeno (APC o células dendríticas) son responsable de fijar y procesar estos antígenos relacionados con la enfermedad y los presentan a las células T, con la proliferación que resulta de células T activadas, específicas de los antígenos. Por presentación en esta posición del compuesto biológico natural derivado de células primarias, en vez de sistémicamente, existe la oportunidad de
10 facilitar o movilizar la función de las células dendríticas, así como también activar directamente células T para que proliferen y lleguen a ser células CTL. Adicionalmente, por aplicación más directa se permiten exposiciones menores a fármacos y se pierde menos sustancia medicamentosa activa de citoquinas que en la circulación sistémica.

15 Han sido evaluadas en ensayos clínicos dosis individuales de citoquinas para determinar su toxicidad y se ha encontrado que tienen perfiles típicos de toxicidad dependiendo de las dosis. Por el contrario, las curvas de dosis-respuesta de citoquinas tienen típicamente forma de campana. Muchas citoquinas están aprobadas para uso terapéutico humano o han sido evaluadas en estudios clínicos de Fase I o de Fase II. Cuando se somete a ensayo, el perfil de toxicidad dependiente de las dosis de las citoquinas investigadas no ha resultado afectado por la administración simultánea de otras citoquinas. Basada en la historia del uso en el pasado, un cuadro comparativo de dosis recomendadas o evaluadas en el umbral de toxicidad de diversas citoquinas y la cantidad que presentan las
20 citoquinas en un curso completo de IRX-2, se expone en la Tabla 3 junto con el margen probable de seguridad, en órdenes de magnitud, como sigue.

Tabla 3. Comparación de dosis máximas de citoquinas de IRX-2 frente a dosis terapéuticas

Citoquina	Especificaciones nuevas de límites superiores	Dosis acumulativas de IRX-2 con especificación nueva de límite superior	Dosis terapéuticas (Administración sistémica)	Escala Log de margen de seguridad
IL-2	8000 pg/ml	³ 3360 UI	>1.000.000.000 UI	>6
IFN- γ	3800 pg/ml	⁴ 0,076 pg	450 μ g	>3,5
IL-1 β	1400 pg/ml	⁴ 0,028 μ g	10 μ g	>2,5
TNF- α	4300 pg/ml	⁴ 0,086 pg	200 μ g	>3
Bioactividad de IL-2	310 UI/ml	⁴ 6200 UI	>1.000.000.000 Ui	>6

³ Cálculo: 8000 pg de IL-2/ml x 0,021 UI/pg x 20 ml = 3380 UI.
⁴ Especificaciones nuevas x (10 x 2) ml = dosis máxima acumulativa de IRX-2.:

Dados estos márgenes de seguridad, es improbable que pudiera resultar un impacto toxicológico importante con las dosis de las citoquinas individuales contenidas en IRX-2.

25 Como se emplea en esta memoria “células mononucleares” (MNCs) son células del sistema hematopoyético que no contienen gránulos. Las MNCs incluyen linfocitos, células plasmáticas, monocitos y macrófagos, y células cebadas.

30 Como se emplea en esta memoria los “agentes adventicios” son virus y toxinas, y con frecuencia agentes infecciosos, que accidentalmente pueden contaminar una línea celular. Se desea en la presente invención que los agentes adventicios sean separados del compuesto biológico derivado de células primarias antes de administrar a un paciente para reducir o eliminar la posibilidad de infección de enfermedades indeseadas.

El procedimiento de la presente invención está detallado en la columna de la derecha de la FIGURA 2. Cada una de las etapas del procedimiento de la invención puede aumentarse a escala para producir cantidades grandes del compuesto biológico derivado de células primarias.

35 En la primera etapa del procedimiento, las MNCs son purificadas para separar cualesquiera células que pudieran ser contaminantes para la producción del compuesto biológico derivado de células primarias, mediante el empleo de un procesador de células, que es un dispositivo centrífugo programable. Este dispositivo se describe, además, en los Ejemplos que figuran más adelante. Las MNCs se enriquecen para que estén compuestas de linfocitos y monocitos, cargando las MNCs en Medio de Separación de Linfocitos (LSM) y centrifugando después las MNCs. Preferiblemente, se utilizan 300 ml de LSM. Las MNCs procedentes de donantes son purificadas simultáneamente, lo que significa que muchos donantes pueden ser purificados inmediatamente. De preferencia, se purifican
40 simultáneamente MNCs procedentes de 12 donantes. La purificación de células por centrifugación de las MNCs se realiza, preferiblemente, a 1500 a 3000 rpm para optimizar la separación de granulocitos y hematíes.

En general, la primera etapa es un método automatizado de purificación de células que se realiza cargando células en un procesador de células automatizado, lavando y centrifugando las células automáticamente, y obteniendo células purificadas. En otras palabras, el método automatizado puede utilizarse para cualesquiera células cuya purificación se desee, y no se limita a las MNCs. De modo importante, el empleo del procesador de células automatizado permite el aumento o disminución a escala de las células purificadas mediante el ajuste de las especificaciones del procesador de células.

Tal proceso de purificación ha sido utilizado con anterioridad para, simplemente, purificar células para el uso subsiguientes de las células. No ha sido utilizado para producir citoquinas ni ha sido utilizado para producir citoquinas naturales.

Después, las MNCs se almacenan durante la noche en un sistema de bolsa estéril cerrada. Preferiblemente, la bolsa es una bolsa de etileno propileno fluorado (FEP). El uso de las bolsas en la presente invención optimiza la producción de citoquinas por encima de los niveles normales de producción. Esto es debido al medio ambiente rico en O₂, de las bolsas, que es óptimo para la producción de citoquinas.

Al día siguiente, se estimula una mezcla de inducción de las MNCs con PHA durante 2 horas y ciprofloxacina durante 2 horas, a 37°C, en CO₂ al 5%. Preferiblemente, se utiliza 80 µg/ml de ciprofloxacina. La inducción tiene lugar en un dispositivo de cultivos celulares, que se puede utilizar a escala, que permite inducir cantidades mayores de mezclas que las que han sido inducidas anteriormente. La inducción con el dispositivo de cultivos celulares que puede utilizarse a escala, permite la producción de citoquinas en cantidades mayores que las que han sido inducidas anteriormente en el método manual. Así pues, en general, la presente invención proporciona un método de inducción de células por inducción de células en un sistema de cultivo celular que puede utilizarse a escala. Pueden inducirse células para obtener cualquier producto celular, tal como las citoquinas inducidas en la presente invención. El proceso no se limita a la inducción de citoquinas y puede inducirse cualquier producto deseado.

Después se separa de la mezcla de inducción la PHA por filtración. Más específicamente, la mezcla de inducción se lava con solución salina estéril, se recuperan las MNCs y luego se vuelven a suspender en un medio de cultivo con 80 µg/ml de ciprofloxacina. Preferiblemente, el nivel de PHA se reduce a menos que <150 ng/ml. Preferiblemente, el filtro es el filtro de Fibra Hueca Spectrum® CellFlow Plus®, y opera en modo de flujo tangencial. La mezcla de incubación se incuba después, preferiblemente durante 24 horas. Normalmente, se emplean procesos de lavado de células para obtener las células que hayan de ser empleadas. La presente invención usa lavado para separar PHA, pero las células se devuelven al cultivo con objeto de producir más citoquinas. Los filtros utilizados en esta etapa y en cada una de las etapas del procedimiento, son realizables a escala y puede emplearse cualquier filtro apropiado. Al cabo de 24 horas ha sido producido el compuesto biológico derivado de células primarias constituido por citoquinas de tipo I (TH1). La mezcla de inducción se clarifica luego, es decir, se recolecta, para obtener el sobrenadante del compuesto biológico derivado de células primarias procedente de las MNCs. Las células se filtran con una membrana fluorodine con un filtro de 0,45 µm. Preferiblemente, el filtro es un filtro FLUORODYNE II TM (Pall), que se utiliza y describe adicionalmente en los Ejemplos. Esta etapa automática proporciona ventajas sobre el procedimiento anterior manual de centrifugación de obtención del compuesto biológico derivado de células primarias.

La última etapa del método de producción es la limpieza de DNA y de agentes adventicios del sobrenadante del compuesto biológico derivado de células primarias, mediante el empleo de cromatografía de intercambio iónico y filtración de virus por 15 nanómetros. Puede conseguirse una inactivación viral adicional con el empleo de UVC. Diversos agentes adventicios pueden ser separados, según se ha descrito antes, tales como virus y DNA. Los virus retirados incluyen, pero no se limitan a virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis B (HBV), virus linfotrópico T humano (HTLV), virus 40 de simios (SV40), parvovirus porcino (PPV), virus pseudorables (PRV), virus de la hepatitis A (HAV), virus de la diarrea viral bovina (BVDV), y Sindbis-, Reo- y Adeno-virus. Preferiblemente, las etapas de cromatografía de intercambio iónico y filtración de virus por 15 nanómetros separan virus en más de 4 log₁₀.

Cuando se emplea UVC, ésta se distribuye uniformemente al compuesto biológico derivado de células primarias haciendo circular en flujo en espiral el sobrenadante del compuesto biológico derivado de células primarias a lo largo de una fuente de irradiación UVC. Preferiblemente, la UVC se emite en una longitud de onda de 254 nm al compuesto biológico derivado de células primarias y en una dosis de hasta 150 J/m².

Preferiblemente, el único compuesto biológico derivado de células primarias producido es el IRX-2 (antiguamente conocido como NCM). Las citoquinas producidas en el IRX-2 incluyen IL-1β, IL-2 e IFN-γ. Preferiblemente, las citoquinas IL-2 e IL-1β son producidas en la proporción de i=:1. Preferiblemente, más de 4 L de IRX-2 en total se producen en un lote. Preferiblemente, el sobrenadante del compuesto biológico derivado de células primarias puede concentrarse y formularse a 300-1800 pg/ml de IL-1β, 4000-8000 pg/ml de IL-2, 1000-3800 pg/ml de IFN-γ, y 1000-4300 pg/ml de TNF-α. La mezcla de inducción puede, opcionalmente, gasearse activamente.

Los resultados que figuran en esta memoria ponen de manifiesto que el procedimiento de obtención de IRX-2 mejora significativamente mediante las mejoras del procedimiento que figuran a continuación: (1) purificación de las MNCs utilizando el procesador de células automatizado; (2) almacenamiento de las MNCs en bolsas de FEP

VUELIFE® (American Fluoroseal Corporation); (3) inducción en un dispositivo de cultivo celular que puede realizarse a escala; (4) lavado de las células empleando un sistema de filtros de Fibra Hueca (HF) ; (5) clarificación del sobrenadante de cultivo por filtración con el empleo de un filtro de 0,45 μm ; (6) separación de DNA empleando filtración de cromatografía de intercambio aniónico; (7) separación de virus empleando filtros dobles de 15 nanómetros, en serie; y (8) inactivación viral adicional que puede conseguirse por aplicación de UVC. Una verificación de cada operación unitaria y de sus cambios, muestra que los parámetros críticos se mantienen dentro de un intervalo de trabajo aceptable y que el procedimiento es capaz de proporcionar un producto que cumple sus especificaciones.

El procedimiento comercial se evaluó adicionalmente produciendo varios lotes con la totalidad de las modificaciones del procedimiento, que produjeron todas las citoquinas del IRX-2 en las proporciones típicas según se había apreciado anteriormente con el procedimiento manual. La capacidad de comparación de componentes biológicos derivados de células primarias y la equivalencia biológica, se confirmaron mediante la Serie de Anticuerpos de Citoquinas Humanas (Human Cytokine Antibody Array) RAYBIO (RayBiotech, Inc.) y el modelo de vacuna peptídica conjugada. Basándose en estos resultados, el procedimiento comercial es comparable con el procedimiento manual de obtención de IRX-2, dando lugar a un producto consistente y reproducible.

Como expone la FIGURA 2, se realizaron desarrollos/cambios con respecto al procedimiento anterior de obtención de IRX-2 en cada una de las etapas siguientes de fabricación. Primeramente, en la etapa de purificación, hubo el cambio de centrifugación manual a un procesador de células automatizado. El almacenamiento durante la noche de las MNCs se cambió desde el almacenamiento durante la noche de las MNC en tubos de polipropileno al almacenamiento de las MNCs en bolsas de FEP VUELIFE®. El lavado de las células se mejoró cambiando de centrifugación manual a un sistema de filtros de Fibra Hueca (HF). La inducción se mejoró y se consiguió la posibilidad de realización a escala del procedimiento empleando un dispositivo de cultivo celular desechable (Cell Factory). Asimismo, la recolección/clarificación del sobrenadante del cultivo se mejoró cambiando de centrifugación manual a filtración de un solo paso empleando un filtro de 0,45 μm . La separación de DNA se mejoró por filtración con filtros de cromatografía de intercambio aniónico. La separación de virus se mejoró por filtración con filtro dobles de 15 nanómetros dispuestos en serie. Además, la inactivación de virus puede mejorarse empleando UVC.

Debido a estos cambios, el procedimiento comercial de fabricación de IRX-2 ha sido mejorado con respecto al procedimiento manual anterior. En conjunto, una disminución del tiempo y de los esfuerzos de producción mediante el uso del procesador de células automatizado elimina muchos de los errores y de las variaciones producidas entre lotes de IRX-2 del procedimiento anterior. Por ejemplo, el error de operador disminuye debido a la automatización. Se consigue un volumen aumentado proporcionalmente debido al diseño y a la automatización del sistema. Además, se evitan contaminaciones debido a que se emplea un sistema de bolsa cerrada que proporciona un tratamiento aséptico, lo que constituye una enorme ventaja respecto al procedimiento anterior. Las ventajas de la limpieza viral se discuten seguidamente.

El método comercial de fabricación de IRX-2 incluye limpieza viral por nanofiltración con filtros 15N en serie, como una etapa dedicada a la separación de virus e incluye también la separación de DNA mediante la unidad de cromatografía de intercambio aniónico desechable. Se ha puesto de manifiesto que los filtros 15N son sumamente eficaces para la separación de virus de la inmunodeficiencia humana de Tipo 1 (HIV-1) virus pseudorables (PRV), virus de la hepatitis A (HAV), virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y parvovirus porcino (PPV) en estudios llevados a cabo por el fabricante y los usuarios finales. Por el contrario, se ha puesto de manifiesto que la cromatografía de intercambio aniónico es eficaz contra virus seleccionados diana. Es sumamente aconsejable disponer de dos métodos ortogonales que son capaces de separar o inactivar una diversidad de virus modelo con objeto de asegurar del mejor modo la seguridad del paciente (Puntos de la FDA a considerar, 1993).

Con objeto de incorporar un método adicional de limpieza viral al procedimiento de obtención de IRX-2, se añade inactivación por UVC como una etapa de inactivación de la presente invención. Como se discute adicionalmente en los Ejemplos que figuran más adelante, se llevaron a cabo estudios a lo largo de un amplio intervalo de dosis UV desde 20-150 J/m^2 , y se puso de manifiesto que no había cambio importante en el contenido de citoquinas, mediante el ensayo ELISA de citoquinas, transferencia western, exploración de series de citoquinas o bioensayo CTLL-2. Además, se desarrolló un nuevo ensayo para el TNF- α , que mide la bioactividad de esta citoquina lábil. Aun cuando se detectó alguna disminución de bioactividad del TNF- α , esta pérdida era comparable a la pérdida apreciada típicamente en otras etapas del tratamiento. A esas mismas dosis de UVC (100 J/m^2) se consiguió más de 4 \log_{10} de inactivación viral para los virus modelo PPV y BVDV, y para el virus HAV llevado por la sangre. El HIV fue inactivado mínimamente con una inactivación viral $< 2 \log_{10}$. Utilizando esta tecnología de UVC, se obtuvieron con éxito en el laboratorio muchos lotes de IRX-2 a la escala corriente y se pasaron especificaciones de aceptación de los graneles confirmando la robustez del proceso de UVC. El procedimiento mejorado proporciona una mejor protección de los pacientes al incluir una etapa de inactivación que es robusta y puede inactivar una amplia gama de contaminantes que incluye virus sin cubierta tales como el virus de la hepatitis A y el parvovirus B19, y virus con cubierta (virus de la hepatitis C).

Los resultados expuestos en los Ejemplos resumen el desarrollo de una nueva tecnología de inactivación viral, irradiación UVC, capaz de complementar los métodos de limpieza viral sin hacer disminuir significativamente los rendimientos de las citoquinas de IRX-2. Basado en estos requisitos y el material fuente, leucocitos humanos, la

inactivación de 4 log₁₀ de los virus de ensayo es el objetivo deseado para considerar útil este procedimiento operatorio adicional . La inactivación por UVC, combinada con los dos métodos existentes de limpieza viral del procedimiento de obtención de IRX-2, intercambio iónico y filtración por 15N, podría aumentar potencialmente la inactivación/separación viral global hasta 12 log₁₀ o más, de virus sin cubierta.

5 Se llevaron a cabo desarrollo/cambios en el procedimiento de obtención de IRX-2, en las etapas de fabricación que siguen: centrifugación automatizada, Cobe 2991, de tratamiento de células, uso de bolsas estériles para el almacenamiento de los linfocitos, inducción en un dispositivo de cultivo celular desechable, lavado de las células por filtración con filtros de fibra hueca, separación de DNA por cromatografía de intercambio aniónico, separación viral por filtración con doble filtro de 15 nanómetros, en serie, e inactivación viral adicional por UVC. La Figura 2 ilustra el
10 procedimiento de obtención de IRX-2 con la adición de inactivación viral por UVC,

La invención se describe adicionalmente en detalle con referencia a los ejemplos experimentales que siguen. Estos ejemplos se proporcionan solamente con la finalidad de ilustración y no están destinados a ser limitantes a menos que se especifique de otro modo. Por tanto, la presente invención no debe considerarse en modo alguno, limitada a los ejemplos que siguen, sino más bien, considerarse que incluye una cualquiera y todas las variaciones que
15 lleguen a ser evidentes como resultado de la enseñanza que se proporciona en esta memoria.

Ejemplo 1

Purificación de MNCs utilizando procesador de células/almacenamiento en bolsas de FEP

Estudios de fracciones de LSM

La finalidad de la etapa de purificación del LSM del procedimiento de obtención de IRX-2, es separar las células
20 contaminantes (granulocitos, hematíes y plaquetas), para obtener una preparación enriquecida de células mononucleares (MNCs) compuesta de linfocitos y monocitos.

Los granulocitos pueden causar mal rendimiento de citoquinas por interferir con el recuento celular exacto de las MNCs así como interferir también con la inducción de PHA (es decir, por fijación de PHA). El límite de granulocitos del procedimiento actual no ha sido determinado todavía. Al principio del desarrollo del procedimiento de obtención
25 de IRX-2 la separación de granulocitos se monitorizó en el analizador hemocitológico Ac•T diff2 de Coulter y el límite del proceso se estableció en 5% de NMT (límite de detección del Ac•T diff 2)

En el procedimiento anterior, las MNCs se purifican manualmente empleando centrifugación sobre gradientes de densidad de Medio de Separación de Linfocitos (LSM, equivalente a FICOLL-HYPAQUE 1077 (Sigma). Cada donación se purifica por separado y hasta 24 donaciones se agrupan inmediatamente antes de la inducción de
30 citoquinas. Este procedimiento da como resultado alta pureza pero no es adecuado para realizar a escala ampliada debido a las limitaciones del tratamiento manual que requiere dos operarios a jornada total de 8-10 horas para tratar 24 donantes (12 donantes por operario).

En el procedimiento modificado de la presente invención, la purificación del LSM se realiza utilizando un sistema de bolsa estéril cerrada y un dispositivo de centrifugación programable, un procesador de células. El procedimiento
35 comercial permite tratar los leucocitos en grupos de donantes de 12. Esto posibilita que un operario pueda tratar hasta 36 donantes por turno.

En el procedimiento comercial se llenan bolsas asépticamente y se agrupan los leucocitos. Las bolsas de leucocitos se fijan asépticamente a un arnés. Los leucocitos son agrupados en una única bolsa y la bolsa se cierra herméticamente por calor. La bolsa se instala en el Procesador de Células y se alinean las válvulas y los tubos con
40 código de colores. Los leucocitos se cargan y se someten a centrifugación. Se prepara una capa anteaada, se concentra y se recoge. Se instala una segunda bolsa en el Procesador de Células. La capa anteaada se distribuye en capas sobre el LSM a 20 ml/minuto, y se somete a centrifugación durante 20 minutos. Se separan las MNCs a una tercera bolsa. Las células se lavan con solución salina en los ciclos de lavado programados, y se vuelven a suspender en medios de cultivo exentos de suero.

45 Resultados:

Para analizar la posibilidad de utilizar el procesador de células para purificar MNCs en LSM, el desarrollo inicial del procedimiento operatorio implicó purificar MNCs por medio de un procesador de células y recoger asépticamente en fracciones las células expresadas. Estas fracciones se analizaron mediante el analizador Ac•T diff2 de Coulter poniéndose de manifiesto que las MNCs purificadas pueden recogerse esencialmente libres de granulocitos.

50

Tabla 4. Análisis por el Ac•T diff 2 de Coulter de fracciones de MNCs recogidas

Fracción	Células totales (10 ⁸)	Volumen (ml)	% de Linfocitos	% de Monocitos	% de Granulocitos
1	0,075	25	_n.d.	-	-
2	0,025	25	-	-	-
3*	20	25	88	9	2,2
4*	15	25	90	7,5	2,4
5*	2,7	25	88	5,9	5,7
6*	1,3	25	89	3,4	7,4
7	0,85	25	88	2,2	9,8
8	0,48	25	81	3,9	14,7
9	0,30	25	73	4,7	21,9
10	0,25	25	-	-	-
Fracciones agrupadas; n.d. = nada detectado					

La Figura 3 y la Tabla 4 exponen la distribución celular relativa de las fracciones recogidas desde el procesador de células. Esto demuestra el potencial para recoger hasta 100 ml de MNCs desde el procesador de células que cumplen la pureza requerida ($\leq 5\%$ de granulocitos), con un rendimiento total de células tan alto como 4×10^9 células. Esto se considera equivalente a un aumento de 10 veces de las células que pueden ser purificadas por un solo operario. Las fracciones que contenían la mayor parte de las MNCs (Fracciones 3-8) fueron recogidas asépticamente, agrupadas y lavadas mediante el método de lavado estándar, y almacenadas durante la noche en bolsas de FEP.

Las MNCs se emplearon para producir un lote de IRX-2 con los niveles de citoquinas, de IL-1 β , IL-2 e IFN- γ , apropiados para la producción de IRX-2-

Estudios de almacenamiento de MNCs

En el procedimiento anterior las MNCs purificadas se almacenan durante la noche en tubos de centrifuga de polipropileno. Debido al gran volumen de MNCs producido por operación utilizando el procesador de células se implementó una alternativa para el almacenamiento de 40 ml de MNCs de donantes individuales (aproximadamente 5×10^8) en tubos de polipropileno de 200 ml. Para acomodar los altos rendimientos de células se utilizaron bolsas (FEP) para almacenar MNCs durante la noche (37°C, CO₂ al 5%). Bolsas de almacenamiento de FEP han sido utilizadas para la expansión de células dendríticas, el almacenamiento de linfocitos humanos y la producción de células LAK, y son adecuadas para el almacenamiento de linfocitos debido a la alta permeabilidad a los gases y bajas propiedades de unión. Para almacenar las células, la concentración en las bolsas de FEP se ajustó para que fuera equivalente a la concentración de almacenamiento en tubos de polipropileno. La viabilidad de las MNCs y la concentración celular fueron verificadas utilizando el GUAVA VIACOUNT (Guava Technologies)

Las MNCs se retiran asépticamente de su bolsa y se hacen pasar asépticamente a la bolsa de FEP. Las bolsas de FEP se almacenan durante la noche.

Resultados:

El procedimiento operatorio de almacenamiento durante la noche se evaluó comparando la concentración y la viabilidad celulares de las MNCs purificadas. Se evaluaron muestras mediante el Guava®Viacount® el Día 1 (en el momento de la dilución en bolsas de FEP) y el Día 2 (antes de la inducción de PHA). Como puede apreciarse en la Tabla 5, las MNCs no manifestaban pérdida de la concentración celular y retenían alta viabilidad (95%) durante el almacenamiento durante la noche, lo que demuestra la capacidad de adecuación de los métodos de almacenamiento.

Tabla 5. Análisis de la población de células de MNCs purificadas en el procesador de células mediante Viacount

Preparación de MNC	Día 1, Viacount		Día 2, Viacount	
	células/ml*(x 10 ⁷)	% de viabilidad	células/ml+(x10 ⁷)	% de viabilidad
N=20	1,9 ± 0,2	96 ± 2,1	1,9 ± 0,3	95 ± 3,5
media ± desviación típica				

Caracterización de los tipos de células y estudios de distribución:

5 Para evaluar completamente las MNCs producidas en el procesador de células. se examinaron las diversas poblaciones de células existentes en las MNCs purificadas para determinar la capacidad de comparación de las células producidas por el nuevo método frente a las obtenidas por purificación manual en LSM. Las MNCs fueron analizadas utilizando marcador de diferenciación celular (CD) por el clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) para cuantificar las poblaciones de células.

Resultados:

10 En la Tabla 6 se presentan resultados sobre la distribución de poblaciones de células, tanto para las MNCs preparadas por el método manual de purificación en LSM, como para las preparadas por el método automatizado del procesador de células.

15 Para el método original, el análisis de FACS se efectuó el Día 2, MNCs agrupadas, inmediatamente antes de la inducción con PHA. Para el procedimiento comercial se tomaron muestras de poblaciones de células y se sometieron a ensayo el Día 1 (antes de almacenamiento durante la noche) y el Día 2 (después de almacenamiento durante la noche), ambos.

Tabla 6. Análisis por FACS de poblaciones de MNCs purificadas por el procesador de células

Muestra	Monocitos CD14+/45+	Linfocitos CD14-/45+	Granulocitos CD15+	Célula T CD3+	Células B CD19+	Células NK CD16/56+
Procedimiento manual: Día 2 (n = 13*)	18 ± 3	80 ± 4	1 ± 0,4	55 ± 4	7 ± 2	8 ± 2
Procedimiento comercial. Día 1 ² (n=25)	18 ± 3	69 ± 6	2,2 ± 2,3	47 ± 8	9 ± 3	13 ± 3
Procedimiento comercial Día 2 ² (n=25)	12 ± 4	75 ± 5	1,7 ± 1,6	54 ± 5	8 ± 2	12 ± 4
Resultados presentados como tanto por ciento de células totales (media ± desviación típica)						

20 Los resultados de la Tabla 10 confirman la equivalencia del procedimiento comercial al método manual.. Las preparaciones de MNC que resultan fueron producidas con un contenido de granulocitos por debajo de a especificación actual de ≤ 5% como se predice en la bibliografía de que se dispone (Brutel de la Riviere et al., 1977). Este resultado indica que las MNCs generadas por el procesador de células son equivalentes al método estándar en cuanto a la distribución y pureza celulares.

25 Se observó que la concentración de monocitos (CD14+/CD45+) aparece consistentemente más baja en el procedimiento comercial después de incubación (Día 2) comparada con la del método del procedimiento manual. El examen de las MNC recién preparadas (Día 1) reveló que había un ligero descenso en la población del marcador de monocitos (CD14+), de 18% a 12%.

La ligera diferencia en la población de células se investigo posteriormente determinando la población de células de las MNCs purificadas por el procesador de células inmediatamente después del tratamiento y antes de la incubación durante la noche,

30 La Tabla 10 expone que las células mononucleares cuya muestra se tomó inmediatamente desde el procesador de células, aparecen comparables a lo visto para el procedimiento anterior. Es evidente como se desprende de estos resultados, que el momento en que las células son sometidas a la toma de muestra y analizadas tiene un gran

efecto sobre el perfil de la población. En el procedimiento nuevo, las células cuya muestra se tomó después de almacenamiento durante la noche tenían un desplazamiento ligeramente inferior en el marcador CD14+ CD45+ de monocitos. Este cambio en la población de CD14+ CD45+ puede atribuirse a la activación de monocitos con linfocitos heterólogos de los donantes; a esto se denomina una reacción mixta de linfocitos (MLR). Según la bibliografía (Jordan y Ritter, 2002), esta reacción puede primar a las células T para producir citoquinas TH1 (es decir IL-1 β , TNF- α e IFN- γ), que son los productos principales del procedimiento de obtención de IRX-2. Dado que éstas citoquinas son deseadas en el producto, el mantenimiento del grupo durante la noche no manifiesta impacto negativo sobre la producción de IRX-2.

Estudios de lotes de 2-3 litros

- 10 La finalidad de este estudio fue producir varios lotes de desarrollo de IRX-2 de 2-3 litros utilizando MNCs purificadas por procesador de células. Las preparaciones celulares de MNCs procedentes de varias operaciones, realizadas el mismo día, fueron agrupadas para obtener células suficientes para producir una tanda de 10 dispositivos de cultivos celulares .

Resultados:

- 15 La equivalencia de producción de citoquinas con el procedimiento comercial se confirmó mediante numerosos ensayos ELISA y el bioensayo CTLL-2. Los intervalos de las diversas citoquinas del producto final se predijeron normalizando las citoquinas a una concentración de 7000 pg/ml de IL-2. Como puede apreciarse en la tabla 7, el producto en masa producido pudo formularse para que pasara todos los ensayos de citoquinas, y son comparable con los del producto clínico de Fase I y Fase II.

- 20 Tabla 7. Producción de citoquinas de IRX-2 obtenido utilizando MNCs purificadas por un procesador de células

Descripción	Bioactividad de IL-2 (UI/ml)	Citoquinas, ELISA (pg/ml)			
		IL-1b	IL-2	IFN- γ	TNF- α
Masa (n=5)	560 \pm 57	2.273 \pm 402	21.428 \pm 1880	6820 \pm 2064	10.279 \pm 2299
Normalizado (n=5)	184 \pm 26	741 \pm 111	7000	2261 \pm 773	3350 \pm 620
Especificación de Control de Calidad	75-310	300-1400	4000-8000	1000-3800	1000-4000
Manual	76	418	5263	2028	1356
Manual	145	615	5797	1502	1815

Resultados presentados como media \pm desviación típica.

- 25 La diferencia principal del procedimiento modificado es que las MNCs purificadas que resultan procedentes de muchos donantes (monocitos, células T, células B y células NK) se incuban juntas durante la noche antes de la inducción con mitógeno. Para confirmar que no han sido producidas nuevas especies de citoquinas con este método, especialmente citoquinas TH2 (es decir, IL-3, IL-4 e IL-5) y probar la capacidad de comparación de la producción de citoquinas de las MNCs generadas por el procesador de células, el IRX-2 obtenido por el procedimiento modificado se analizó por medio de una serie de citoquinas (Array 3, RAYBIO Human Cytokine Antibody (Ray Biotech. Inc.) que detecta 42 citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, humanos. El análisis de la serie de estas citoquinas más comunes (Huang et al., 2001) realizado sobre IRX-2 procedente de células generadas con procesador de células, confirmó que el perfil del producto comercial de IRX-2 o "huella", es comparable en la composición de citoquinas con la del producto común y que no han sido inducidas nuevas citoquinas (es decir, citoquinas de Tipo 2) como puede apreciarse en la FIGURA 4..

Ejemplo 2

Lavado de células empleando el sistema de filtro de Fibra Hueca

- 35 Se desarrolló un método automatizado de lavado de MNCs, que separa eficazmente la fitohemaglutinina (PHA) química del proceso, un mitógeno, de las MNCs inducidas, a niveles comparables con el lavado mediante centrifugación manual al tiempo que mantiene la viabilidad celular y la aptitud para producir citoquinas de IRX-2.

En la segunda etapa del procedimiento de obtención de IRX-2, MNCs agrupadas son inducidas para producir biológicamente citoquinas activas mediante la adición de un mitógeno, fitohemaglutinina (PHA) y ciprofloxacina. En

conjunción con PHA, la ciprofloxacina estimula las células que inducen transcripción de citoquinas de tipo 1, que incluyen IL-2 e IFN- γ . Después de la inducción, la mezcla de inducción, medio de cultivo y células, se recolecta asépticamente y las células se recuperan por centrifugación. El dispositivo de cultivo celular se lava tres veces con solución salina estéril recuperándose aproximadamente 20% de las células de los lavados reunidos, permaneciendo aproximadamente el 80% de las células fijadas a las superficies de CF. Las células recuperadas se suspendieron de nuevo después en medio de cultivo X-Vivo 10 de nueva aportación, con 80 $\mu\text{g/ml}$ de ciprofloxacina y se devolvieron al dispositivo de cultivo celular. La generación de citoquinas tiene lugar a lo largo de un período adicional de 24 horas produciendo la masa de IRX-2 libre de mitógenos.

Para evaluar la eficacia del proceso de lavado y asegurar un residuo mínimo de la impureza del procedimiento, el producto final, en masa, se ensaya para determinar la cantidad residual de PHA mediante un ensayo ELISA. La especificación de PHA residual para el producto final es $< 150 \text{ ng/ml}$, el límite de detección del ensayo ELISA para PHA.

En el método mejorado el lavado de las células y la separación de PHA se llevan a cabo mediante filtración por fibras huecas en modo de flujo tangencial. Además de la producción de citoquinas, los parámetros críticos utilizados para demostrar equivalencia son la separación de PHA y la recuperación de células viables.

Resultados:

Para determinar con mayor exactitud estos bajos niveles residuales de PHA se desarrolló y validó un nuevo ensayo ELISA de PHA, más sensible. La Tabla 8 compara el contenido de PHA de un lote de IRX-2 de uso clínico, procesado empleando centrifugación (que se utilizó en la producción clínica de Fase II), con el de seis lotes en los que el lavado se había realizado mediante el método de filtración por fibra hueca. Con el nuevo método el mitógeno había sido separado hasta un nivel más bajo que el del límite de la especificación para PHA.

Tabla 8, Contenido de PHA después de separación por centrifugación o filtración por fibra hueca

Lote	Volumen del lote (ml)	Volumen del lavado con solución salina	Método de lavado	Concentración de PHA (ng/ml)*
Límite de la especificación	N/A	N/A	N/A	<150
Procedimiento manual Fase II	2800	1,8 litros	Centrifugación	104
Fibra Hueca N = 6	2000 - 3500	2 – 3 litros	Filtración por fibra hueca	¹ 91 ± 30

* Resultados presentados como media \pm desviación típica fecha de ensayo 11/06/06 Pre-MQ

La Tabla 9 presenta el % de recuperación de células de las células lavadas empleando el método de lavado por fibra hueca, de dos lotes diferentes. Como puede apreciarse, la mezcla de incubación recuperada de la factoría de células después de las dos horas de incubación (marcado "Contenidos de CF") contiene una fracción pequeña de las células de partida (12%) inducidas inicialmente en el dispositivo de cultivo celular. Estos resultados confirman, después del proceso de lavado por fibra hueca, que las células habían sido recuperadas con una viabilidad adecuada y pérdida mínima, dentro de la variabilidad del ensayo, como se determinó por exclusión con el colorante azul tripán

Tabla 9. Exclusión con el colorante azul tripán de MNCs recuperadas durante el lavado por fibras huecas

Recuento de células viables		
Descripción de la muestra	Células totales	% de recuperación
Células totales en la cubeta de Pre-inducción con PHA	$6,2 \times 10^9$	100
Contenidos de CF	$6,9 \times 10^8$	12
Primer lavado	$4,5 \times 10^8$	7
Segundo lavado	$1,9 \times 10^8$	3
Tercer lavado	$2,8 \times 10^7$	1

Recuento de células viables		
Descripción de la muestra	Células totales	% de recuperación
Células totales de las etapas de lavado	1,3 x 10 ⁹	23
Concentrado de células recuperado en XVG después de lavar y diafiltración	1,5 x 10 ⁹	24

El análisis de las citoquinas producidas por células lavadas por el método nuevo se presenta en la Tabla 10 que expone las citoquinas típicas de IRX-2-

Tabla 10. Producción de citoquinas de IRX-2 obtenida empleando filtración por fibras huecas

Descripción	Bioactividad de IL-2 UI/ml	Citoquinas, ELISA (pg/ml)			
		IL-1b	IL-2	IFN- γ	TNF- α
Procedimiento manual de Fase II	204	899	10.470	2576	2264
Fibra hueca Media \pm d.t. N = 2	194 \pm 58	1035 \pm 858	11.999 \pm 3984	2423 \pm 858	5956 \pm 3230

¹ Resultados presentados como media \pm desviación típica (d.t.)

- 5 Estos resultados preliminares confirmaron que el sistema de filtros de fibra hueca (HF) puede ser empleado para lavar células, reemplazando al procedimiento manual de centrifugación, trabajoso y que consume tiempo, con separación adecuada de PHA, y adecuada recuperación y producción de citoquinas en la obtención de IRX-2.

Ejemplo 3

Recolección/clarificación de sobrenadante de cultivo de IRX-2

- 10 Se desarrolló un método de clarificación de sobrenadantes por filtración con filtro de 0,45 micrómetros, que separa eficazmente células desde los sobrenadantes de cultivos y que es comparable con el procedimiento manual de centrifugación sin reducir apreciablemente los rendimientos de citoquinas de IRX-2. Se ha puesto de manifiesto que ocasiona poca separación de citoquinas de IRX-2 críticas. La clarificación de sobrenadantes se expone en la FIGURA 12.

Resultados:

- 15 Durante el procedimiento admitido de obtención de IRX-2 el sobrenadante del cultivo que contiene las citoquinas inducidas fue clarificado (es decir, sometido a separación de células) utilizando centrifugación. Con objeto de establecer la línea de flujo y aumentar a escala el procedimiento, se evaluó un filtro de membrana de 0,45 micrómetros. Para la separación de células y la clarificación de los sobrenadantes. El mismo material de membrana de PVDF se empleó en otras etapas del procedimiento de obtención de IRX-2 (pre-filtro de intercambio aniónico y
- 20 filtro de grado de esterilización del producto final) y se seleccionó para que la unión de proteínas fuera mínima. La evaluación de los resultados obtenidos demuestra una separación mínima de las citoquinas cuando el sobrenadante del cultivo de IRX-2 se filtró a través de la membrana fluorodine (Tabla 11). El filtro puede ser realizado a escala (usando la relación entre el volumen del lote y la superficie de filtración, y a delta P constante) según el tamaño del lote de IRX-2 requerido.

25

Tabla 11. % de recuperación de citoquinas utilizando filtración por filtro de PVDF de 0,45 micrómetros

Muestra	(% de recuperación)				
	Bioactividad de IL-2	Citoquinas, ELISA			
		IL-1 β	IL-2	IFN- γ	TNF- α
PVDF de 0,45 micrómetros (n = 3)	101 \pm 16	94 \pm 8	96 \pm 7	103 \pm 13	92 \pm 12
Media \pm desviación típica					

Ejemplo 4

Posibilidad de fabricación de lotes

- 5 La finalidad de este estudio es producir varios lotes en la escala admitida (2-3 litros) combinando todos los nuevos métodos de producción de IRX-2. Este estudio puede confirmar que estos métodos automatizables que pueden "llevarse a escala" para producir IRX-2, son comparables con los del procedimiento manual de obtención de IRX-2..

Resultados:

- 10 Se prepararon tres lotes de posibilidad de obtención utilizando la totalidad de la modificación del procedimiento descrito en esta solicitud de patente. El análisis de citoquinas del IRX-2 obtenido como producto utilizando el procedimiento modificado en su totalidad, se presenta en la Tabla 12. Estos lotes fueron normalizados a una concentración diana de IL-2 de 7000 pg/ml y comparados con dos lotes clínicos producidos mediante el procedimiento manual. El análisis de estos lotes puso de manifiesto que el procedimiento nuevo producía IRX-2 de los intervalos típicos de las citoquinas.

Tabla 12. Análisis de citoquinas de IRX-2 producido por el procedimiento comercial

Descripción	Bioactividad de IL-2* (UI/ml)	Citoquinas, ELISA (pg/ml)^			
		IL-1b	IL-2	IFN- γ	TNF- α
Procedimiento comercial N = 3	322 \pm 120	1933 \pm 559	15.416 \pm 6973	3349 \pm 1899	4856 \pm 2117
Comercial normalizado					
Procedimiento comercial N = 3	152 \pm 29	939 \pm 203	7000	1504 \pm 293	2216 \pm 61
Clínico					
Manual Fase I	76	418	5263	2028	1356
Manual Fase II	145	615	5797	1502	1815

- 15 Se confirmó también que la separación de PHA mediante el método de lavado por fibras huecas proporcionaba un producto aceptable con niveles de PHA que cumplían la especificación de aceptabilidad del Control de Calidad, de > 150 ng/ml (Tabla 13) y proporciona una dosis típica de 50 ng/kg muy por debajo del nivel de administración segura (167 ng/kg) o un nivel de toxicidad (833.000 ng/kg), 4 órdenes de magnitud por debajo.. Esto demuestra claramente que los bajos niveles de mitógenos residuales del procedimiento, representan un producto seguro.

20

Tabla 13. Contenido de PHA después de separación por centrifugación o fibra hueca

Descripción	Volumen del lote (ml)	Volumen del lavado con solución salina	Método de lavado	Concentración de PHA (ng/ml)*
Límite de la especificación	N/A	N(A	N/A	< 150
Procedimiento manual Fase II	1500	1.2 litros	Centrifugación	63
HF N = 3	2500 – 3500 ml	4 – 5 litros	filtración por fibra hueca	64 ± 7

* Antes de cromatografía de intercambio aniónico y filtración viral

Además del ensayo analítico, el IRX-2 producido por el procedimiento modificado mostró, asimismo, comportamiento de equivalencia en un modelo *in vivo*, el modelo de vacuna de conjugado peptídico. Se ha puesto de manifiesto que el IRX-2 provoca una respuesta de células T en el ratón, medida por la generación de células T citotóxicas o mediante una hipersensibilidad retardada típica, DTH (Naylor y Hadden, 2003). Muestras de IRX-2 obtenido por el procedimiento manual y por el procedimiento comercial, ambos, indujeron una reacción de hipersensibilidad retardada típica (DTH) en el ratón utilizando como antígeno un conjugado de KLH-péptido PSMA (Tabla 14 y FIGURA 5). Esto confirma un comportamiento biológico equivalente en un modelo *in vivo* y proporciona datos que apoyan la facultad de comparación del IRX-2 obtenido por el procedimiento modificado.

Tabla 14. Estudios de actividad *in vivo* de evaluación de IRX-2 de Procedimiento manual frente a IRX-2 de procedimiento comercial

Muestra de IRX-2	Citoquinas, ELISA (pg/ml)				
	IL-2	IL-1b	IFN- γ	TNF- α	IL-8
Manual Fase II	5797	516	1502	1815	49180
Manual	6870	403	1688	1798	34824
Comercial (Experimento 1)	7000	667	2544	3917	46671
Comercial (Experimento 2)	7000	667	2544	3917	46671

Protocolo: Se inmunizaron ratones con vacuna de conjugado KLH-PSMA y se preparó IRX-2 o bien mediante el procedimiento estándar o bien por el procedimiento modificado. Los ratones recibieron una inyección adicional de IRX-2 solo el día 9 y se les administraron dosis de refuerzo los días 14 y 28. La respuesta de DTH a los péptidos se midió como aumento de la hinchazón de la huella 9 días después de la inmunización de refuerzo.

Conclusión:

Los resultados expuestos en esta memoria ponen de manifiesto que el procedimiento de obtención de IRX-2 está mejorado de modo importante por las mejoras del procedimiento propuestas: (1) purificación de MNCs empleando el procesador de células automatizado; (2) almacenamiento de las MNCs en bolsas de FEP; (3) lavado de las células usando un sistema de filtros de Fibra Hueca (HF); (4) inducción y generación de citoquinas en un dispositivo de cultivos celulares desechable, y (5) clarificación del sobrenadante de cultivo por filtración utilizando un filtro de PVDF de 0,45 μ m. La verificación de cada operación unitaria y sus cambios, muestra que los parámetros críticos se mantienen dentro de un intervalo aceptable de trabajo y que el procedimiento es capaz de proporcionar un producto que cumple sus especificaciones. El procedimiento se evaluó, además, produciendo varios lotes con todas las modificaciones del procedimiento que producían la totalidad de las citoquinas de IRX-2 en las proporciones típicas según se había apreciado anteriormente con el procedimiento admitido. La facultad de comparación de los componentes biológicos derivados de células primarias y de la equivalencia biológica, se confirmaron mediante el RAYBIO Human Cytokine Antibody Array (RayBiotech. Inc) y el modelo de vacuna de conjugado de péptido. Basado en estos resultados, el procedimiento modificado es comparable con el procedimiento admitido de obtención de IRX-2 y da lugar a un producto consistente y reproducible. Un resumen de los cambios puede encontrarse en la Tabla 21 que figura más adelante.

Ejemplo 5

Eliminación de virus

Como se ha establecido antes en esta memoria, el método anterior de fabricación de IRX-2 incluye limpieza viral por nanofiltración utilizando dobles filtros 15N en serie como una etapa dedicada de separación de virus e incluye también separación de DNA mediante la unidad de cromatografía de intercambio aniónico desechable (MQ).

Tratamiento de UVC

5 El sistema UVC, un reactor con una nueva acción de mezclado hidráulico de flujo espiral, fue diseñado para superar esas limitaciones y encaminar su aplicación para uso en productos de biotecnología (Schmidt et al., 2005; Schmidt y Kauling. 2007). Estudios realizados con el sistema UVC han demostrado la eficacia del tratamiento por UVC, en el nuevo reactor, para inactivar virus sin ocasionar daño importante a las proteínas (Wang et al., 2004). Se sometieron a ensayo soluciones de virus y de inhibidor de Alfa₁-proteínasa (Alfa₁PI) simulado, fijado, fueron ensayadas con
10 dosis diversas de UVC. Las muestras de virus fueron analizadas para determinar su infectividad residual y amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las muestras simuladas, fijadas, se analizaron también para determinar la integridad de las proteínas. Alfa₁PI, una proteína plasmática, fue seleccionada como la proteína diana debido a la presencia de aminoácidos que absorben radiación UV, por lo que el daño inducido por la radiación UV podría detectarse con facilidad por una disminución de la actividad biológica. Se ensayó
15 un grupo diverso de virus que incluía virus con cubierta y sin cubierta, con genomas de RNA o DNA monocatenarios o de doble cadena, largos o cortos. El tratamiento de UVC de Alfa₁-PI dio como resultado una inactivación de más de 4 log₁₀ de los virus SC40, PPV, HAV, Sindbisvirus, Reovirus y Adenovirus lo que demuestra que todos los virus de ensayo habían sido inactivados con independencia del tipo de ácido nucleico o de la presencia de una cubierta.

En este estudio se descubrió que los virus con los genomas más pequeños, eran los más sensibles al tratamiento de
20 UVC y que la detección de amplicones de la PCR de 2,0 kb estaba correlacionada con la infectividad viral. Las dosis que conseguían una inactivación importante de los virus, produjeron una recuperación de >90% de la actividad de las proteínas incluso en ausencia de apagadores. La cinética de la inactivación viral era relativamente lineal y no persistían pequeñas fracciones de virus resistentes. Además, se puso de manifiesto que el PPV era un modelo adecuado para B19 en estudios de irradiación UV, realizados tanto por PCR como por ensayos de infectividad. Un
25 compendio del desarrollo del proceso para el tratamiento de UVC está indicado en la Tabla 22 que figura más adelante.

Sistema UVC UVivatec®

En el reactor de UVC, se emplea un nuevo flujo hidráulico en espiral a lo largo de una fuente de irradiación, lo que induce un mezclado sumamente eficaz en una corriente de un fluido, por lo que pueden distribuirse altas dosis de
30 irradiación UVC suave y uniformemente a través de toda la solución, así que los tiempos de permanencia en la cámara de irradiación son sumamente cortos y el tratamiento de UVC puede regularse. (Wang et al., 2004; Schmidt y Kauling, 2007). Un conducto tubular de poli(tetrafluoroetileno) que forma espirales en torno a un tubo de cuarzo con una fuente concéntrica de UVC (254 nm) forma la cámara de irradiación del reactor. A medida que las corrientes de fluido se mueven en espiral a lo largo de la lámpara, se generan corrientes secundarias que circulan (vórtices Dean),
35 que proporcionan un mezclado de alta eficacia que optimiza la exposición de los virus a la fuente de radiación UV y permite una irradiación uniforme y regulable del volumen completo..

Para optimizar la actividad virucida de la UVC y reducir al mínimo el daño para las proteínas, el sistema UVC utiliza irradiación UVC en una longitud de onda de 254 nm. Se seleccionó esta longitud de onda para hacer diana,
40 específicamente, en el componente de ácidos nucleicos del virus. La Figura 7 ilustra cómo son inactivados los virus en esta longitud de onda al tiempo que las proteínas quedan relativamente sin afectar (Schmidt et al., 2007).

Además, la dosis requerida para inactivar virus es 10 veces menor que las descritas con anterioridad para la irradiación UV empleada para un producto plasmático, 1000-2000 J/m² (Chin et al., 1995; Chin et al., 1997; Caillet-Fauquet et al., 2004, Sugawara et al., 2001).

La dosificación de UVC se describe, típicamente, en unidades de fluencia de UV y depende de: (1) irradiación media emitida por la lámpara, (2) tiempo de permanencia en la cámara de irradiación, y (3) la densidad óptica de la
45 solución de ensayo, ($W \text{ s/cm}^2 = \text{J/cm}^2$) (Wang et al., 2004; Liet al., 2005). Antes del tratamiento de UVC se mide la absorbancia A₂₅₄ de la solución para determinar la interferencia generada por la solución de proteína, y basándose en la A₂₅₄ se calcula el caudal requerido para conseguir la dosis requerida.

Estudios de limpieza viral

50 El procedimiento comercial de obtención de IRX-2 incluye dos métodos de limpieza viral validados para separar o inactivar hasta 11 log₁₀ de la contaminación viral adventicia (a saber, cromatografía de intercambio aniónico y filtración por 15 nm). Se evaluó un tercer método, inactivación de virus por UV, (UVC), para usar en el procedimiento de obtención de IRX-2. De conformidad con los datos publicados con anterioridad con respecto a la tecnología UVC (Wang et al., 2004; Schmidt et al., 2005; Schmidt y Kauling, 2007),. las dosis que se sabe que destruyen virus
55 adventicios sin cubierta, hasta 150 J/m², ponen de manifiesto una inactivación mínima de las citoquinas de IRX-2.

Se puso de manifiesto que la dosis de 100 J/m² inactivaba 4 logs de varios virus diana, con inclusión de PPV y HAV (Wang et al., 2004; Schmidt et al., 2005; Schmidt y Kauling, 2007), y se expuso que tenía un efecto mínimo sobre las citoquinas de IRX-2. Por consiguiente, se seleccionó esta dosis como la dosis diana para IRX-2.

- 5 La selección de virus que se empleó en este estudio, se basó en la naturaleza y origen del material de partida y de las materias primas empleadas en la producción (es decir, el producto biotecnológico derivado de leucocitos humanos). Cada uno de los virus utilizados es un virus relevante que puede contaminar el material originario (en este caso la sangre humana) o un modelo reconocido de las especies contaminantes esperadas. Además, los virus modelo fueron seleccionados por su aptitud para crecer y crear una reserva de título alto (en medio sin suero o de bajo contenido de proteína) y su facilidad de detección en un ensayo sensible y fidedigno. Los virus utilizados en este estudio fueron: HIV-1, BVDV, HAV, y PPV. Los virus empleados representan una amplia gama de propiedades físico-químicas, con objeto de poder ensayar a fondo la aptitud de los sistemas UVC para eliminar virus. No era de esperar que el sistema UVC en estos intervalos bajos de dosis, >100 J/m², pudiera ser eficaz contra virus mayores con cubierta. Por consiguiente, virus pseudorables (PRV), sustituto típico de virus grandes con cubierta de DNA, no se ensayó en este estudio preliminar.
- 10
- 15 La capacidad de limpieza viral del sistema UVC en el IRX-2, se confirmó en dos estudios de limpieza viral. A una muestra de IRX-2 (aproximadamente 50 ml) se añadió virus modelo y virus transportados en la sangre, y se expuso a dosis de UVC que variaban de 40 a 150 J/m². La Tabla 15 expone los resultados a 100 J/m² y han demostrado que la tecnología de UVC puede proporcionar 4 log₁₀ de inactivación de virus.

Tabla 15. Compendio de limpieza viral

Tipo de virus	Log ₁₀ de la limpieza viral			
	Mustang-Q	Doble 15N	UVC*	Total
PPV	4,30	≥7,24	7,37	≥18,9
HIV-1	≥4,39	≥4,18	1,93	≥10,5
HAV	ND*	≥5,28	5,90	≥11,2
BVDV	ND*	≥6,01**	5,31	≥11,3**
PRV	≥4,5	≥6,45	nd ⁺	≥10,9
100 J/m ² ; ** Calculado de un único filtro 15N; + No determinado ≥				

- 20 En condiciones de realización del procedimiento a escala reducida, el sistema UVC demostró más de 4 log₁₀ de limpieza viral para tres de los virus ensayados, PPV, HAV y BVDV. Más de 7 logs de PPV fueron inactivados con UVC. PPV, un modelo de B-18, es uno de los virus más pequeños y más difíciles de inactivar por otros métodos, disolvente/detergente, pH o calor (Chin et al., 1996). Estudios recientes han confirmado la adecuación del PPV para ser un modelo adecuado de B-19 en comparación en paralelo durante la inactivación por UVC (Wang et al., 2004) El parvovirus humano, B-19, pueda alcanzar >10¹² UI/ml, en plasma humano y constituye un riesgo potencial para productos derivados de la sangre (Doley y Corcoran, 2006). El HIV-1 fue inactivado menos eficazmente por UVC, 1,9 logs, posiblemente debido al mayor tamaño de su genoma. (80-110 nm), lo que, potencialmente, hace más difícil inactivarle con UVC (Wang et al., 2004).pero cuando se añade al procedimiento de obtención de IRX-2 aumenta la limpieza viral en mas de 10 logs₁₀.
- 25
- 30 Este estudio valida la eficacia de la etapa de UVC para el procedimiento de obtención de IRX-2. Además, el sistema UVC demostró una separación de PPV, HAV y BVDV mayor de 4 logs., proporcionando de este modo una etapa adicional de limpieza viral del procedimiento de obtención de IRX-2. Con la adición de UVC, el resultado indica que se puso de manifiesto que la limpieza total a través de las etapas del procedimiento acumulativas, validadas, era ≥10,5 logs para HIV-1, ≥11,2 para HAV, ≥11,3 para BVDV y ≥18,9 logs para PPV.
- 35 UVC para lote de 2-3 litros
- Para evaluar completamente el sistema UVC, se prepararon 4 lotes utilizando el procedimiento nuevo, incluyendo todos los cambios del procedimiento combinados, con inclusión del tratamiento con UVC (Tabla 16).

Tabla 16. Tanto por ciento de recuperación de IRX-2 durante tratamiento con UVC a escala comercial

% de Recuperación a 100 J/m ²	TNF- α UI/ml	IL-2 UI/ml	Citoquinas (pg/ml)								
			IL-1 β	IL-2	IFN- γ	TNF- α	IL-8	IL-6	IL-10	G-CSF	GM-CSF
media	93 \pm 19	88 \pm 6	96 \pm 7	90 \pm 5	107 \pm 10	92 \pm 21	95 \pm 3	66 \pm 21	95 \pm 32	96 \pm 32	89 \pm 7

Resultados

5 El tratamiento con UVC de lotes de escala de laboratorio, producidos a la escala común, 2-3,5 litros, mostró menos pérdida detectable de bioactividad de TNF- α con un tanto por ciento medio de recuperación de bioactividad de TNF- α de 93% y 92% por ELISA, confirmando de este modo los descubrimientos originales en los estudios a pequeña escala, a saber, que el IRX-2 no es afectado por irradiación UVC en esas condiciones. Todas las otras citoquinas, mediante el ensayo ELISA o el bioensayo (CTLL-2) mostraron muy buena recuperación de citoquinas de IRX-2 en una dosis de 100 J/m² que inactivó eficazmente los virus sin cubierta HAV y PPV.

10 El análisis, Ray Biotech, de la serie de citoquinas más comunes (Huang et al., 2001) de IRX-2, de IRX-2 tratado con UVC, reveló que el IRX-2 obtenido como producto, aparece comparable en composición de citoquinas antes y después del tratamiento con UVC (FIGURA 19)

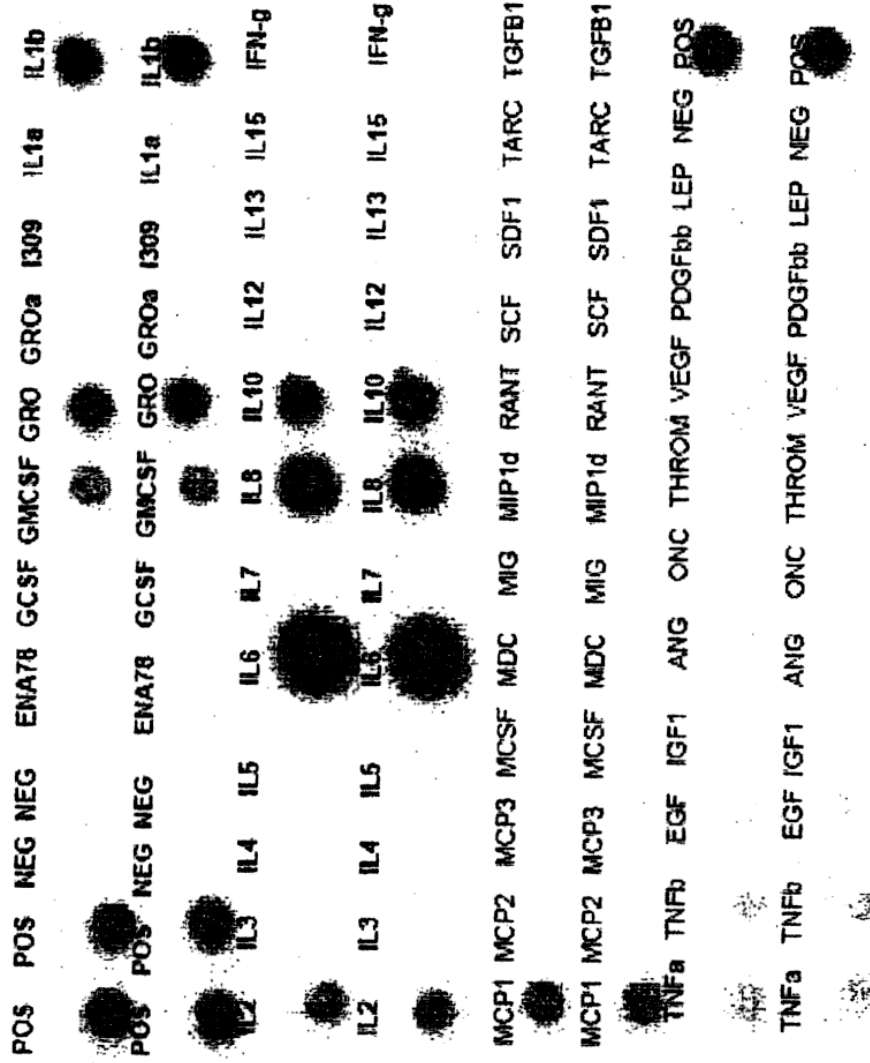
Conclusión:

15 Los resultados indicados en esta memoria muestran que el procedimiento de obtención de IRX-2 está significativamente mejorado por la adición propuesta al procedimiento de inactivación con UVC y puede ser validado como un método de inactivación viral. La adición de una etapa de inactivación cumple los requisitos reguladores y se añade a los métodos de inactivación/separación viral, robustos, comúnmente admitidos, del procedimiento de obtención de IRX-2. La evaluación de esta operación unitaria y sus cambios muestra que los parámetros críticos se mantienen dentro de un intervalo de trabajo aceptable y que el procedimiento es capaz de proporcionar un producto que cumple sus especificaciones. Después de la inactivación con UVC, la masa de IRX-2 obtenida como producto
20 puede congelarse y prepararse para distribuir a los pacientes.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de fabricación y purificación de un compuesto biológico derivado de células primarias, que contiene las citoquinas IL-1 β , IL-2 e IFN- γ , cuyo método incluye las etapas secuenciales de:
- 5 (a) separación de células contaminantes de células mononucleares (MNCs) cargando leucocitos en un medio de separación de linfocitos (LSM), y lavando y centrifugando el medio;
- (b) almacenamiento de las MNCs;
- (c) estimulación de las MNCs con un mitógeno y ciprofloxacina en un sistema de cultivo celular desechable, para producir citoquinas;
- (d) separación del mitógeno de las MNCs;
- 10 (e) incubación de las MNCs en un medio de cultivo;
- (f) separación de las MNCs del medio de cultivo, produciendo con ello un sobrenadante;
- (g) separación de DNA del sobrenadante mediante cromatografía de intercambio aniónico; y
- (h) separación de virus del sobrenadante cromatografiado que resulta.
- 15 caracterizado porque la etapa (a) se lleva a cabo con un sistema automatizado de tratamiento y lavado de células; la etapa (b) se lleva a cabo durante la noche en un sistema de bolsa estéril cerrada; la etapa (d) se lleva a cabo por filtración; la etapa (f) se lleva a cabo por filtración del medio de cultivo de las MNCs; y la etapa (h) se lleva a cabo por filtración con filtros dobles de 15 nanómetros en serie.
- 2.- Un método según la reivindicación 1, en donde dicha etapa (a) comprende, además, separar células contaminantes de MNCs procedentes de muchos donantes simultáneamente.
- 20 3.- Un método según las reivindicaciones 1 ó 2, que se caracteriza, además, porque la etapa (a) comprende centrifugar a 1500 a 3000 rpm durante 20 minutos, para optimizar la separación de granulocitos y de hematíes
- 4.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho mitógeno es fitohemaglutinina (PHA).
- 25 5.- Un método según la reivindicación 4, en donde dicha etapa (d) comprende reducir el nivel de PHA a menos de 150 ng/ml.
- 6.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se caracteriza, además, porque la etapa (d) comprende filtrar en modo de flujo tangencial.
- 7.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la incubación en un medio de cultivo se realiza durante 24 horas.
- 30 8.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se caracteriza, además, porque el filtro de la etapa (h) es un filtro de 0,45 micrómetros.
- 9.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la etapa (h) comprende aplicar luz ultravioleta-C (UVC) al sobrenadante para limpiar el sobrenadante cromatografiado de agentes adventicios.
- 35 10.- Un método según la reivindicación 9, en donde la UVC se aplica uniformemente haciendo fluir en espiral el sobrenadante biológico derivado de células primarias, a lo largo de una fuente de irradiación de UVC.
- 11.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la ciprofloxacina está presente en una cantidad de 80 microgramos/ml, en la etapa (c).
- 12.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho medio de cultivo de la etapa (e) contiene 80 microgramos/ml de ciprofloxacina.
- 40 13.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que se caracteriza, además, porque las células mononucleares (MNCs) purificadas en la etapa (a) poseen un contenido de granulocitos menor que 5%.
- 14.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el método se caracteriza, además, porque la etapa (a) separa plaquetas a un nivel menor que $1,2 \times 10^{10}$ células.
- 45 15.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el compuesto biológico derivado de células primarias contiene, además, las citoquinas IL-6, IL-8 y TNF- α .

FIGURA 1



Procedimiento común	Etapa del Procedimiento	Procedimiento modificado
Donante único, estratificado manualmente sobre LSM	Fase 1 Gradiente de LSM	Cobe [®] 2991 [™] agrupación de 12 donantes
Centrifugación manual y toma con pipeta	Fase 2 Lavado de MNCs (Retirada de LSM)	Cobe [®] 2991 [™] Ciclos de lavado programados
Tubos de polipropileno	Fase 3 Almacenamiento de MNCs	Bolsas de FEP VueLife [®]
Recogida de 24 donantes individuales en tubos de PP	Fase 4 Agrupación de MNCs	Recogida de grupos de 2-3 donantes en bolsas de FEP de VueLife [®]
Nunc Cell Factory [™] a 37°C y 5% de CO ₂	Fase 5 Incubación 2 hr (+PHACiproflo.)	Nunc Cell Factory [™] a 37 °C 5% CO ₂
Centrifugación manual y pipeteo	Fase 6 Lavado de PHA	Fibra Hueca Spectrum [®] CellFlow Plus [®] (TFF/diafiltración)
Cell Factory a 37 °C 5% CO ₂	Fase 7 Incubación 24 hr	Cell Factory a 37 °C 5% CO ₂
Centrifugación manual	Fase 8 Clarificación del sobrenadante	Filtración por Pall Fluorodyne [®] II de 0,45 micrómetros
Filtración por Pall Fluorodyne [®] II de 0,22 μm	Fase 9 Pre-filtración	Filtración por Pall Fluorodyne [®] II de 0,22 μm
Intercambio aniónico Pall Mustang Q [®]	Fase 10 Separación de DNA	Intercambio aniónico Pall Mustang Q [®]
Filtración, Planova 15N	Fase 11 Limpieza viral	Filtración Planova 15N

FIGURA 2

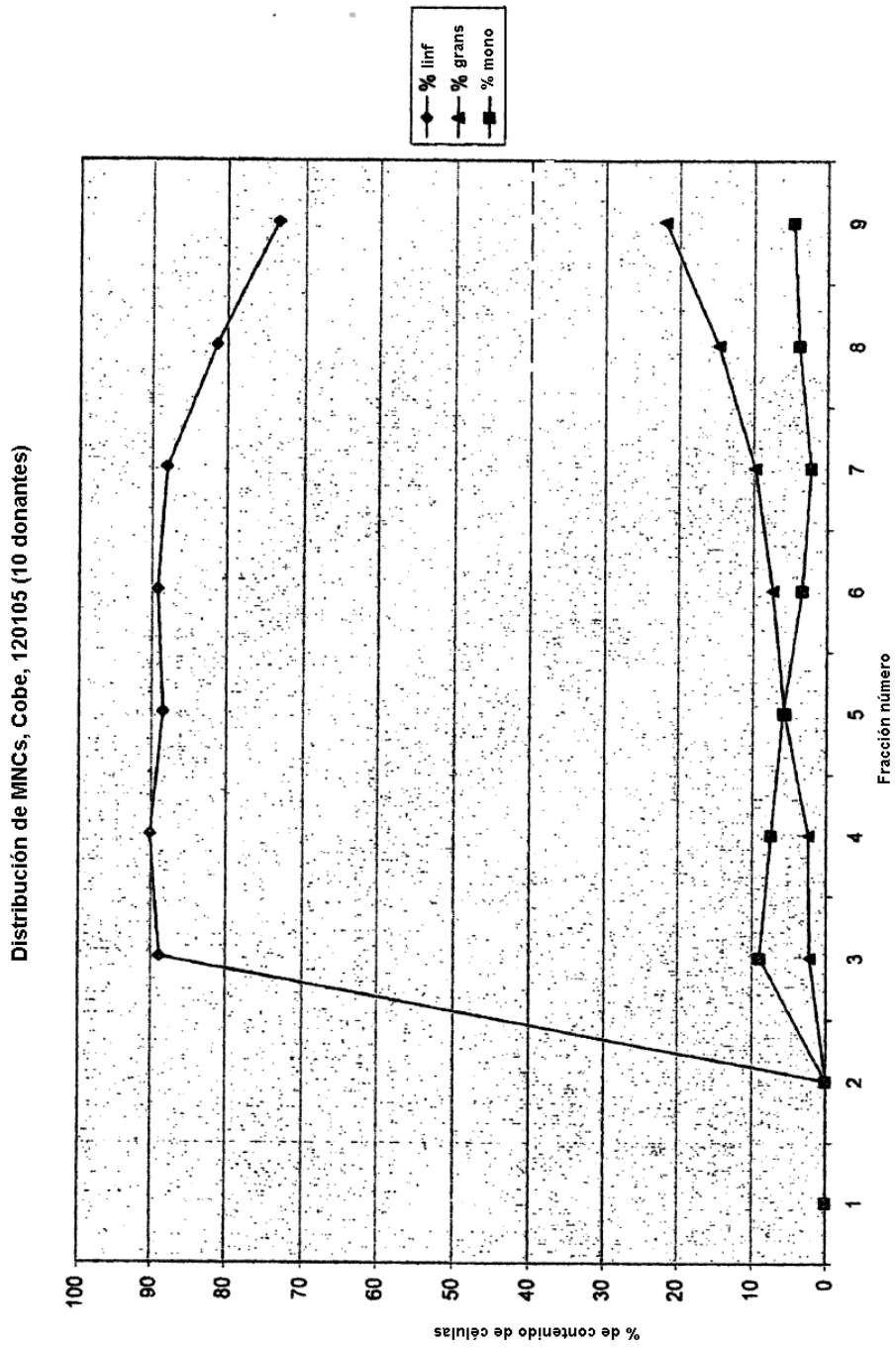


FIGURA 5

FIGURA 7

050206 MQF

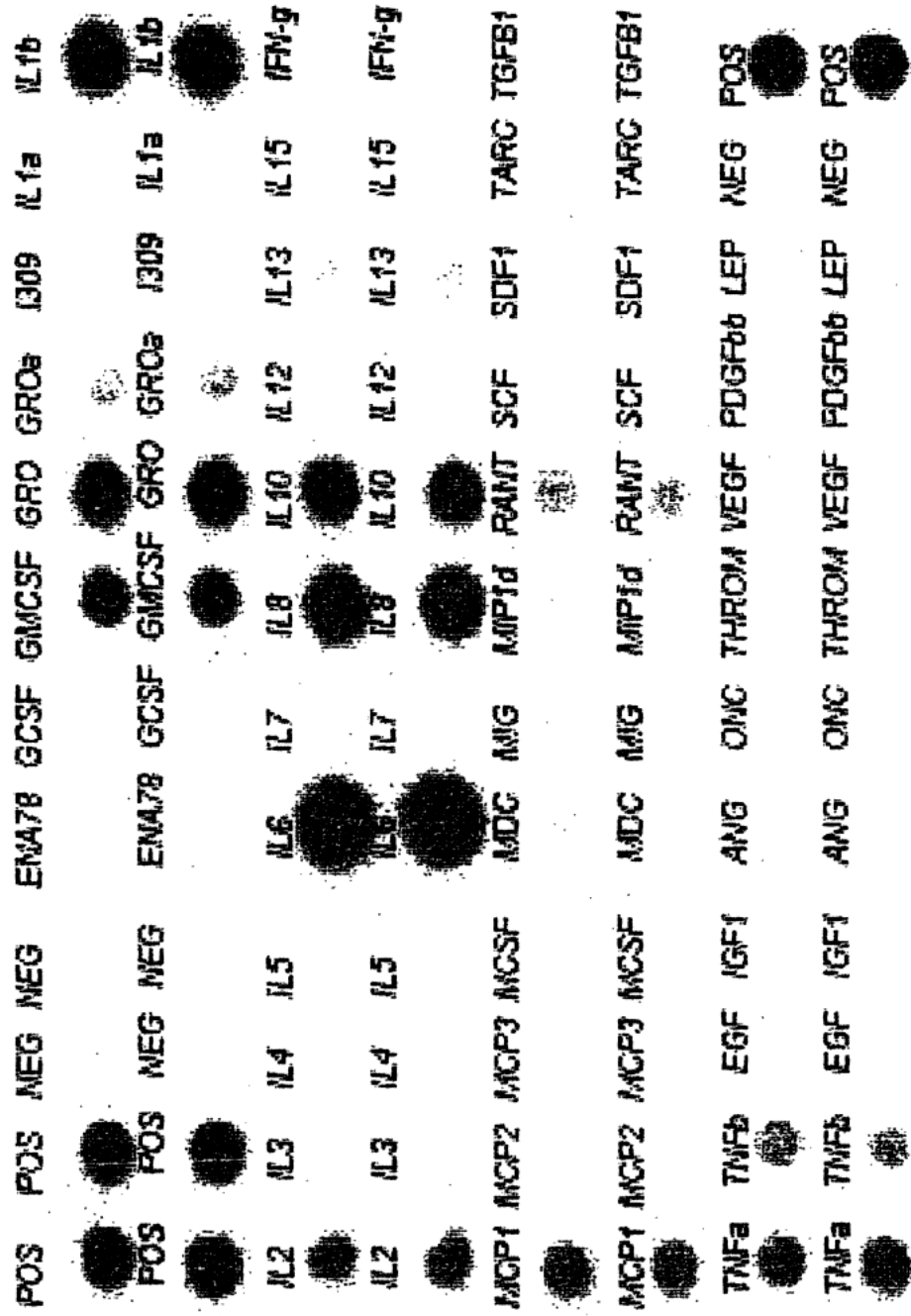


FIGURA 13

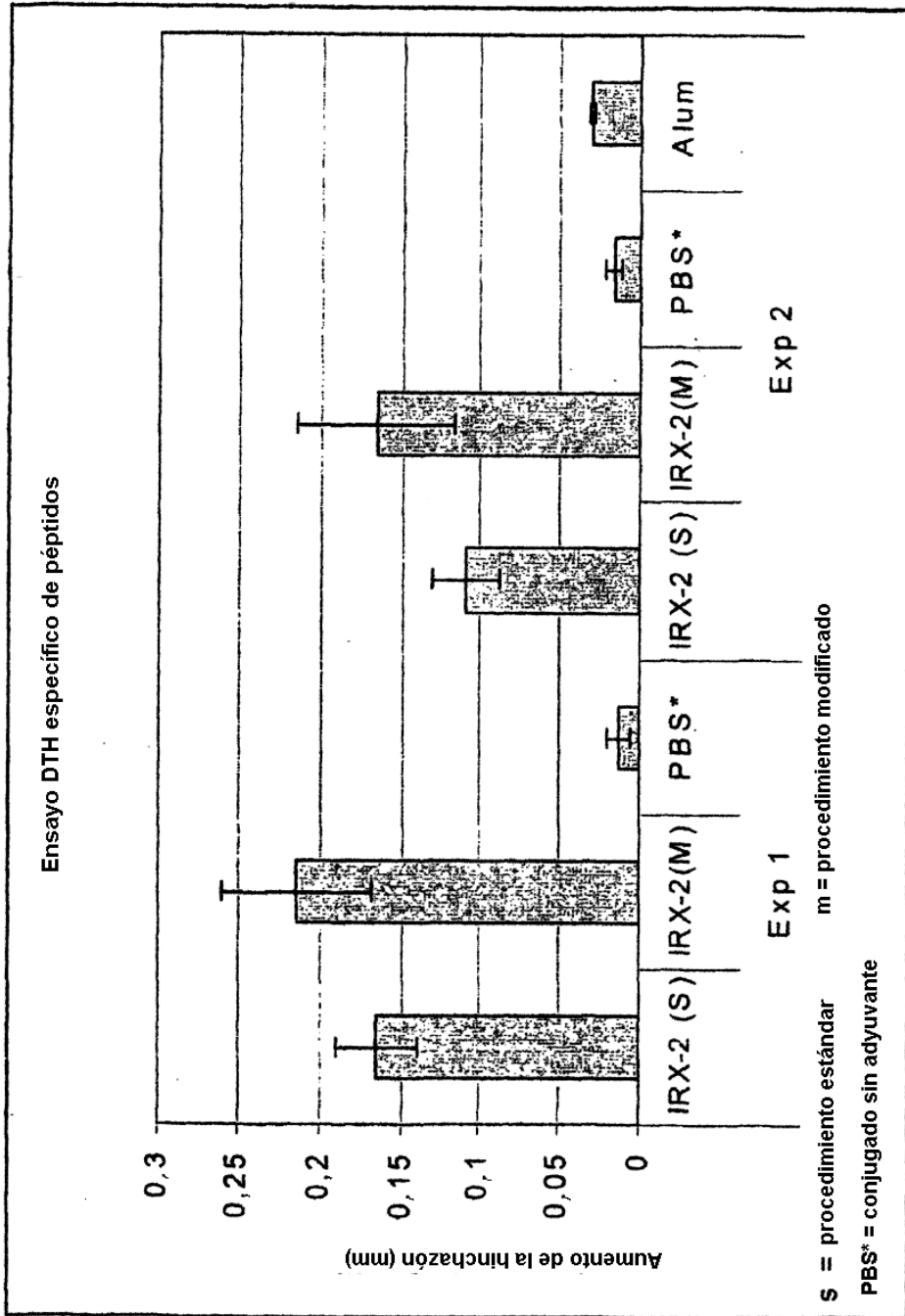


FIGURA 18

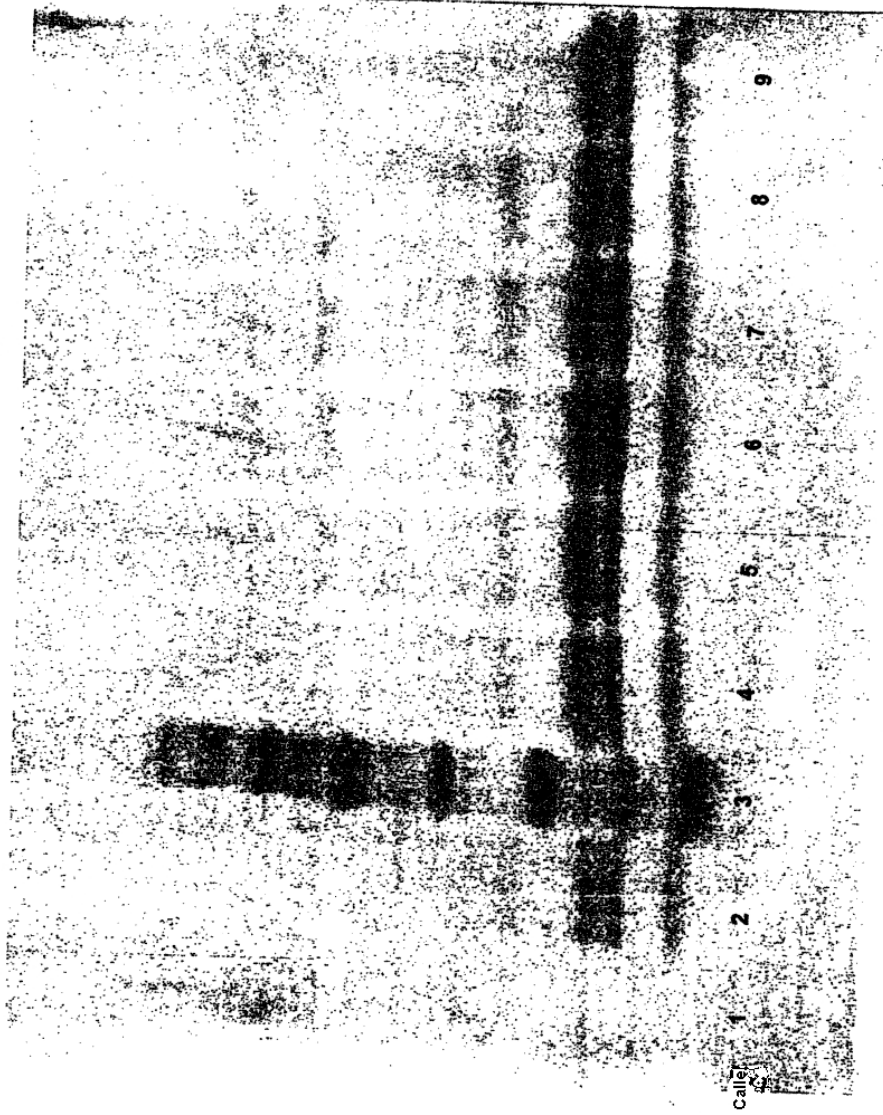


FIGURA 19

091806 Post UVC

091806 Pre UVC

