

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 734**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2009 E 09744006 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2350127**

54 Título: **Aislamiento y purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad con la proteína A**

30 Prioridad:

20.10.2008 US 196753 P

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

14.05.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HICKMAN, ROBERT, K.;
HUANG, QING;
WEED, CHERYL, L.;
ENNIS, SCOTT, T.;
PERILLI-PALMER, BARBARA y
WAN, MIN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 535 734 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aislamiento y purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad con la proteína A

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] Los procedimientos de purificación para anticuerpos monoclonales para uso farmacéutico producidos mediante cultivo de fermentación suelen comprender cuatro etapas básicas. Estas etapas incluyen: (1) recolección/clarificación - separación de células huésped a partir del cultivo de fermentación; (2) captura - separación de anticuerpo a partir de la mayoría de los componentes de la recolección clarificada; (3) purificación fina - eliminación de agregados y contaminantes de la célula huésped; y (4) formulación - introducción del anticuerpo en un excipiente apropiado para aumentar al máximo la estabilidad y el periodo de validez.

[0002] Sin embargo, a menudo estas etapas no dan lugar necesariamente a composiciones de anticuerpos con la suficiente pureza para su uso en contextos farmacéuticos. Actualmente existe la necesidad de contar con procedimientos para producir y purificar un anticuerpo que resulte de interés, en una forma lo suficientemente pura como para ser apta para un uso farmacéutico. La presente invención está dirigida a satisfacer esta necesidad.

[0003] Ishihara y col. (Journal of Chromatography, Elsevier Science Publishers B.V., 2007, vol. 1176, n. ° 1-2) hacen referencia a un procedimiento de purificación de anticuerpos monoclonales, en el que se lleva a cabo una reducción de pH antes de una cromatografía con proteína A.

[0004] Brorson y col. (Biotechnology and Bioengineering, 5 de mayo de 2003, vol. 82, n. ° 3) hacen referencia a una purificación de anticuerpos a partir de virus y HCP (proteína de célula huésped), en la que los procesos implican, en primer lugar, la disminución del pH, a continuación, una cromatografía de afinidad con proteína A y, después, una cromatografía de exclusión por tamaño.

[0005] El documento WO08/07280 hace referencia a un polímero selectivamente soluble y con capacidad para ligarse a la biomolécula escogida en una mezcla que contiene diversos materiales biológicos, y a los procedimientos para usar dicho polímero para purificar una biomolécula a partir de dicha mezcla.

[0006] El documento WO95/22389 hace referencia a la aplicación de una cromatografía en combinación con cromatografía de interacción hidrófoba a la purificación de moléculas de proteínas de anticuerpos.

[0007] El documento WO98/17786 proporciona procedimientos para inactivar virus en preparados de anticuerpos, por ejemplo preparados de anticuerpos monoclonales, mediante un suave calentamiento.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] La presente invención hace referencia a un procedimiento para producir un preparado de anticuerpo, o porción del mismo de unión al antígeno, con un nivel reducido de proteína de célula huésped (HCP, por sus siglas en inglés), a partir de una mezcla de muestra que comprende un anticuerpo, o porción del mismo de unión al antígeno, y al menos una HCP, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) el sometimiento de dicha mezcla de muestra a una reducción en el pH, con lo que se forma una muestra de recuperación primaria, en el que el pH de dicha mezcla de muestra se reduce hasta un pH de 3 a 4 para formar dicha muestra de recuperación primaria;

(b) el ajuste del pH de dicha muestra de recuperación primaria hasta un valor de 6,0 a 8, seguido de;

(c) la puesta en contacto de dicha muestra de recuperación primaria con una resina de cromatografía de afinidad con proteína A, lavado de dicha resina de cromatografía de afinidad con un tampón seleccionado entre el grupo formado por: 1) un tampón que comprende NaCl 0,5M, acetato de sodio 25 mM, con pH 5; 2) un tampón que comprende NaCl 0,5M, acetato de sodio 25 mM, con pH 5,5; y 3) un tampón que comprende NaCl 0,5M, ácido cítrico/citrato sódico 20 mM, con pH 6, y recolección de una muestra de cromatografía de afinidad;

(d) la puesta en contacto de dicha muestra de cromatografía de afinidad con una resina de intercambio iónico y recolección de una muestra de intercambio iónico;

(e) la puesta en contacto de dicha muestra de intercambio iónico con una resina de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y recolección de una muestra de HIC, en la que dicha muestra de HIC comprende dicho preparado de anticuerpo, o porción del mismo de unión a antígeno, con un nivel reducido de HCP.

5 **[0009]** La presente invención se ocupa de procedimientos para aislar y purificar anticuerpos a partir de una matriz de muestra. En ciertos aspectos, la invención se ocupa de procedimientos de purificación de anticuerpos en los que se emplea cromatografía de afinidad, preferentemente cromatografía de afinidad con proteína A. En ciertos aspectos, los procedimientos de la presente descripción emplean una etapa de inactivación ácida, una etapa de cromatografía de afinidad, y una o más etapas adicionales de cromatografía y/o filtración. Las etapas de
10 cromatografía pueden incluir una o más etapas de cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de interacción hidrófoba.

[0010] Una forma de realización de la presente invención se centra en un procedimiento de purificación de un anticuerpo o de su región de unión a partir de una matriz de muestra, de manera que la composición de anticuerpo
15 resultante esté sustancialmente exenta de proteínas de célula huésped («HCP»). En un aspecto, la matriz de muestra (o simplemente «muestra») comprende un cultivo de líneas celulares en el que la línea celular se emplea para producir anticuerpos específicos de la presente invención. En un aspecto particular, la matriz de muestra se prepara a partir de una línea celular usada para producir anticuerpos anti-IL-12; en otro aspecto, la matriz de muestra se prepara a partir de una línea celular usada para producir anticuerpos anti-TNF α ; y en otro aspecto la
20 matriz de muestra se prepara a partir de una línea celular usada para producir anticuerpos anti-IL-18.

[0011] Un procedimiento de la presente invención incluye el sometimiento de una matriz de muestra, que comprende el anticuerpo putativo de interés o su región de unión, a un ajuste del pH. En un aspecto, el pH se ajusta para obtener un pH ácido. Como ejemplo, un pH adecuado está entre 3 y 5, preferentemente es un pH de 3,5. Esta
25 recuperación primaria se lleva a cabo, en parte, para reducir el nivel de virus sensibles al pH o inactivarlos. Además de reducir el nivel de virus y/o inactivarlos, las condiciones ácidas facilitan la eliminación de células y residuos celulares, con lo cual se forma una muestra de recuperación primaria. Tras un periodo de tiempo adecuado, se puede ajustar el pH hasta alcanzar un pH más neutro o básico y la muestra de recuperación primaria se somete a cromatografía de afinidad, preferentemente cromatografía de afinidad con proteína A. En un aspecto, la muestra de
30 cromatografía de afinidad se recolecta y se somete a posteriores etapas de cromatografía como, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico y de interacción hidrófoba.

[0012] En una forma de realización, la etapa de cromatografía de afinidad comprende el sometimiento de la muestra de recuperación primaria a una columna que comprende un soporte cromatográfico adecuado para la
35 cromatografía de afinidad. Como ejemplos no exclusivos de dichos soportes cromatográficos, se pueden citar, entre otros, resina con proteína A, resina con proteína G, soportes de afinidad que comprenden el antígeno contra el cual se generó el anticuerpo de interés, y soportes de afinidad que comprenden una proteína con capacidad de unión al fragmento Fc. La resina con proteína A resulta útil para el aislamiento y la purificación por afinidad de anticuerpos (IgC). En un aspecto, una columna con proteína A se equilibra con un tampón adecuado antes de cargar la muestra.
40 Un ejemplo de tampón adecuado es un tampón Tris/NaCl, pH 7,2. Una vez equilibrada, la muestra se puede cargar en la columna. Tras cargar la muestra en la columna, la columna se puede lavar una o más veces con, por ejemplo, el tampón empleado en el equilibrado. Antes de la elución de la columna, se pueden llevar a cabo otros lavados, incluidos lavados en los que se emplean diferentes tampones. A continuación, se puede llevar a cabo la elución de la columna con proteína A usando un tampón de elución adecuado. Un ejemplo de tampón de elución adecuado es
45 un tampón de ácido acético/NaCl, pH 3,5 aproximadamente. El eluido se puede determinar usando técnicas muy conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un seguimiento de la absorbancia a OD₂₈₀. A continuación, la fracción o fracciones eluidas de interés se pueden preparar para continuar procesándolas.

[0013] En una forma de realización, se lleva a cabo una etapa de intercambio iónico tras la cromatografía de
50 afinidad con proteína A. Esta etapa de intercambio iónico puede consistir en un intercambio catiónico, aniónico o ambos. Esta etapa puede consistir en un único procedimiento de intercambio iónico o puede incluir múltiples etapas de intercambio iónico como, por ejemplo, una etapa de intercambio catiónico seguida de una etapa de intercambio aniónico o viceversa. En un aspecto, la etapa de intercambio iónico es un procedimiento de una etapa. En otro aspecto, la etapa de intercambio iónico incluye un procedimiento de intercambio iónico de dos etapas. Una columna
55 de intercambio catiónico adecuada es una columna cuya fase estacionaria comprende grupos aniónicos. Un ejemplo de dicha columna es una de Fractogel™ SO₃⁻. Esta etapa de cromatografía de captura de intercambio iónico facilita el aislamiento de anticuerpos a partir de una muestra. Una columna de intercambio aniónico adecuada es una columna cuya fase fija comprende grupos catiónicos. Un ejemplo de dicha columna es una columna de Q-Sepharose™. En una o más etapas de intercambio iónico prosigue el aislamiento de anticuerpos mediante la

reducción del nivel de impurezas como las proteínas y ADN de la célula huésped, y, en su caso, proteína de la matriz de afinidad. Este procedimiento de intercambio aniónico es un modo *flow through* de cromatografía, en el que los anticuerpos de interés no interactúan o no se unen a la resina de intercambio aniónico (o fase sólida). Sin embargo, muchas impurezas sí interactúan con la resina de intercambio aniónico y se unen a ella. En un aspecto 5 en particular, la etapa de intercambio iónico consiste en una cromatografía intercambio aniónico.

[0014] El eluido de la cromatografía de afinidad se prepara para el intercambio iónico ajustando el pH y la fuerza iónica del tampón de la muestra. Por ejemplo, el eluido de afinidad se puede ajustar a un pH de 6,0 a 8,5 en un tampón de Tris 1M. Antes de cargar la muestra (el eluido de afinidad) en la columna de intercambio iónico, la 10 columna se puede equilibrar usando un tampón adecuado. Un ejemplo de tampón adecuado es un tampón de Tris/NaCl con un pH de 6,0 a 8. Tras el equilibrado, la columna se puede cargar con el eluido de afinidad. Tras la carga, la columna se puede lavar una o varias veces con un tampón adecuado. Un ejemplo de tampón adecuado es el propio tampón de equilibrado. La recolección del flujo no retenido por la columna (*flow-through*) puede dar comienzo, por ejemplo, cuando la absorbancia (OD₂₈₀) supera las 0,2 unidades de absorbancia (AU).

15 [0015] El presente procedimiento emplea una etapa más. Esta etapa incluye el uso de la cromatografía de interacción hidrófoba («HIC», por sus siglas en inglés). Una columna adecuada es aquella cuya fase estacionaria comprende grupos hidrófobos. Un ejemplo de dicha columna es una columna de Phenyl Sepharose™. Es posible que los anticuerpos de interés hayan formado agregados durante el procedimiento de aislamiento/purificación. Esta 20 etapa de cromatografía hidrófoba facilita la eliminación de estos agregados. Además, ayuda a eliminar las impurezas. El procedimiento usa un tampón de alta salinidad que fomenta la interacción de los anticuerpos (o de sus agregados) con la columna hidrófoba. La columna se eluye usando concentraciones de sal más bajas.

[0016] En otra forma de realización, el eluido de la HIC se filtra usando un filtro de eliminación de virus, como por 25 ejemplo un filtro Ultipor DV20™. Este procedimiento separa partículas víricas del eluido fenílico para reducir la cantidad de virus (en caso de que existan) hasta alcanzar niveles seguros. En esta forma de realización se pueden usar filtros bien conocidos por los expertos en la materia.

[0017] La pureza de los anticuerpos de interés en el producto de muestra resultante se puede analizar mediante 30 procedimientos muy conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, análisis por cromatografía HPLC de Poros™ A, ELISA de HCP, ELISA de proteína A, y análisis de inmunotransferencia.

[0018] En otra forma de realización, la invención está dirigida a la obtención de una o más composiciones 35 farmacéuticas que comprenden un anticuerpo aislado, o porción del mismo de unión al antígeno, y un excipiente aceptable. En otro aspecto, las composiciones comprenden también uno o más agentes farmacéuticos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 [0019]

La **figura 1** desvela las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un ejemplo no exclusivo de un anticuerpo anti-IL-12 (ABT-847).

45 La **figura 2** desvela las secuencias de las cadenas pesadas y ligeras de un ejemplo no exclusivo de un anticuerpo anti-IL-18 (ABT-325).

La **figura 3** desvela las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un ejemplo no 50 exclusivo de un anticuerpo anti-TNF α (Adalimumab).

La **figura 4** ilustra un cromatograma representativo obtenido con un biorreactor de 300 L, que muestra la pureza del producto tras usar una cromatografía con proteína A MabSelect™ para capturar anticuerpos anti-IL-12 y reducir el nivel de impurezas relacionadas con el producto y el procedimiento, tales como fragmentos de cadena ligera simple y doble, proteínas (HCP) y ADN de célula huésped CHO, etc.

55 La **figura 5** ilustra una evaluación de las condiciones de lavado de MabSelect™.

La **figura 6** es una fotografía de un gel de poliacrilamida de precipitados obtenidos después de ajustar el eluido de MabSelect™ a un pH de 8 y una conductividad de 7 mS/cm.

La **figura 7** ilustra un perfil representativo de lavado de la fracción no retenida en una columna cromatográfica de Q-Sepharose™ FF a escala de un biorreactor de 300 L.

5 La **figura 8** ilustra un perfil representativo de elución de una columna de cromatografía de Phenyl-Sepharose™ HP a escala de un biorreactor de 300 L.

La **figura 9** ilustra los resultados de un ensayo de capacidad de unión dinámica en el que se identifica el punto de ruptura del 10% para la resina MabSelect™ en 37,4 g de anticuerpo por L de resina.

10

La **figura 10** es una fotografía de un gel de poliacrilamida tomada para comparar las diferencias intermedias entre el procedimiento con proteína A y el procedimiento con AY-04. Se cargaron 2 µg de anticuerpo de cada muestra.

La **figura 11** ilustra el rendimiento de recuperación de Adalimumab de MabSelect™ frente al pH de la elución. La **figura 11** muestra que se obtuvo un rendimiento de al menos el 90% para un intervalo de pH de elución de 2,5 a 3,8, y que se produce una importante disminución en el rendimiento con pH 4.

15

La **figura 12** ilustra los resultados de un ensayo en el que se compara la recuperación de monómero de Adalimumab frente al pH de la elución y el tiempo de incubación.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] La presente invención está dirigida a proporcionar procedimientos para aislar y purificar anticuerpos a partir de una matriz de muestra. Un aspecto de la invención está dirigido a la reducción/inactivación vírica de muestras generadas en las diversas etapas de la purificación de anticuerpos. En un aspecto en particular, procedimientos descritos en la presente memoria emplean una etapa de reducción/inactivación vírica ácida seguida de una o más etapas cromatográficas. Las etapas cromatográficas pueden incluir uno o más de los siguientes procedimientos cromatográficos: cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, y cromatografía de interacción hidrófoba.

30

[0021] Para mayor claridad, y no como limitación, la presente descripción detallada se divide en los siguientes apartados:

1. Definiciones;
- 35 2. Generación de anticuerpos;
3. Producción de anticuerpos;
4. Purificación de anticuerpos;
5. Procedimientos de análisis de pureza de muestras;
6. Otras modificaciones;
- 40 7. Composiciones farmacéuticas; y
8. Usos de los anticuerpos.

1. Definiciones

45 [0022] Para que la presente invención se pueda entender con mayor facilidad, en primer lugar se definen ciertos términos.

[0023] El término «anticuerpo» incluye una molécula de inmunoglobulina compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante puentes disulfuro. Cada una de las cadenas pesadas está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como HCRV o VH) y una región constante de cadena pesada (CH). La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada una de las cadenas ligeras está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como LCRV o VL) y una región constante de cadena ligera (CH). La región constante de cadena pesada está compuesta por un dominio: CL. A su vez, las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones de determinación de complementariedad, intercaladas con regiones que se conservan más, denominadas regiones estructurales (FR). Cada una de las regiones VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0024] La expresión «porción de unión al antígeno» de un anticuerpo (o «porción de anticuerpo») incluye fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hIL-12, hTNF α , o hIL-18). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo la pueden llevar a cabo fragmentos de un anticuerpo completo. Entre los ejemplos de fragmentos de unión englobados en la expresión «porción de unión al antígeno» de un anticuerpo se incluyen: a) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que comprende los dominios VL, VH, CL y CH1; b) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados mediante un puente disulfuro en la región bisagra; c) un fragmento Fd que comprende los dominios VL y CH1; d) un fragmento Fv que comprende los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; e) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) *Nature* 341:544-546), que comprende un dominio VH; y f) una región de determinación de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes distintos, se pueden unir usando procedimientos de recombinación, mediante un conector (o *linker*) sintético que permite convertirlos en una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv)); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) *Science* 241: 423-426; y Huston y col. (1988) *Procesamiento. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena simple también quedarán englobados en la expresión «porción de unión al antígeno» de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos de cadena simple, tales como los diacuerpos, también quedan englobados. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero usan un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo cual obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y se crean dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., y col., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., y col. (1994) *Structure* 2: 1121-1123). Además, un anticuerpo o porción del mismo de unión al antígeno pueden formar parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos. Entre los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión, se incluye el uso de la región central de estreptavidina para crear una molécula scFv tetramérica (Kipryanov, S. M., y col. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para formar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipryanov, S. M., y col., (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Se pueden preparar porciones de anticuerpos, como por ejemplo fragmentos Fab y F(ab')₂, a partir de anticuerpos enteros usando técnicas convencionales como, por ejemplo, la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos enteros. Además, se pueden obtener anticuerpos, porciones de anticuerpos y moléculas de inmunoadhesión usando técnicas de ADN recombinante convencionales, como se describe en la presente memoria. En un aspecto, las porciones de unión al antígeno son dominios completos o pares de dominios completos.

[0025] La expresión «interleucina humana 12» (abreviada en la presente memoria como hIL-12 o IL-12), según se usa en el presente documento, incluye una citocina humana secretada principalmente por macrófagos y células dendríticas. La expresión incluye una proteína heterodimérica que comprende una subunidad de 35 kD (p35) y una subunidad de 40 kD (p40) que están conectadas entre sí con un puente de disulfuro. La proteína heterodimérica recibe la denominación de «subunidad p70». La estructura de la IL-12 humana es descrita con más detalle, por ejemplo, por Kobayashi y col. (1989) *J. Exp. Med.* 170:827-845; Seder y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:10188-10192; Ling y col. (1995) *J. Exp. Med.* 154:116-127; Podlaski y col (1992) *Arc. Biochem. Biophys.* 294:230-237.

[0026] El ácido nucleico que codifica la IL-12 está disponible con el número de acceso de GenBank NM_000882 y la secuencia de polipéptidos está disponible con el número de acceso de GenBank NP_000873.2. Se entenderá que la expresión IL-12 humana incluye la IL-12 humana recombinante (rh IL-12), que se puede preparar mediante procedimientos convencionales de expresión recombinante.

[0027] La expresión «interleucina humana 18» (abreviada en la presente memoria como hIL-18 o IL-18), tal como se usa en el presente documento incluye una citocina humana que se sintetiza inicialmente como proteína precursora de aminoácido 193 biológicamente inactiva así como la proteína madura de aminoácido 156 mediante, pero no exclusivamente, la escisión de la proteína precursora, por ejemplo, mediante caspasa-1 o caspasa-4, que presenta actividades biológicas que incluyen la coestimulación de la proliferación de células T, el aumento de la citotoxicidad mediada por células NK, la inducción de la producción de IFN- γ por parte de células T y células NK, y la potenciación de la diferenciación de células T colaboradoras (o *T helper*) de tipo 1 (Th1). El ácido nucleico que codifica la IL-18 está disponible con el número de acceso de GenBank NM_001562 y la secuencia de polipéptidos está disponible con el número de acceso de GenBank NP_001553. Se entenderá que la expresión IL-18 humana incluye la IL-18 humana recombinante (rh IL-18), que se puede preparar mediante procedimientos convencionales de expresión recombinante.

[0028] La expresión «factor- α de necrosis de tumor humano» (abreviada en el presente documento como hTNF α o TNF α) es una citocina proinflamatoria multifuncional secretada predominantemente por monocitos/macrófagos que posee efectos sobre el metabolismo de los lípidos, la coagulación, la resistencia insulínica y la función endotelial. El TNF α es un homotrímero soluble de subunidades proteicas de 17 kD. También existe una forma precursora de TNF α de 26 kD unida a membrana. Se encuentra en células sinoviales y macrófagos en tejidos. También existen otras células, aparte de los monocitos o macrófagos, que producen TNF α . Por ejemplo, las líneas celulares tumorales humanas no monocíticas producen TNF α ; así como los linfocitos T CD4+ y CD8+ en sangre periférica y algunos cultivos de líneas de linfocitos T y B también producen TNF α . El ácido nucleico que codifica el TNF α está disponible con el número de acceso de GenBank X02910 y la secuencia de polipéptidos está disponible con el número de acceso de GenBank Caa26669. Se entenderá que la expresión TNF α incluye TNF α humano recombinante (rh TNF α), que se puede preparar mediante procedimientos convencionales de expresión recombinante.

[0029] Las expresiones «numeración de Kabat», «definiciones de Kabat» y «etiquetado de Kabat» se usan de manera indistinta en el presente documento. Estas expresiones, que son reconocidas en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo, o de su porción de unión al antígeno (Kabat y col. (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391 y Kabat, E. A. y col. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación del NIH n. ° 91-3242). Para la región variable de las cadenas pesadas, la región hipervariable está comprendida entre las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2, y las posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de las cadenas ligeras, la región hipervariable está comprendida entre las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2, y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

[0030] La expresión «anticuerpo humano» incluye anticuerpos que poseen regiones variables y constantes correspondientes a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana, tal como describen Kabat y col. (véase Kabat y col. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación del NIH n. ° 91-3242). Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis in vitro aleatoria o específica de sitio, o mediante mutación somática in vivo), por ejemplo, en los CDR y, en particular, en CDR3. Las mutaciones se pueden introducir usando el «enfoque de mutagénesis selectiva». El anticuerpo humano puede tener al menos una posición sustituida con un residuo de aminoácido, por ejemplo, un residuo de aminoácido potenciador de la actividad no codificado por la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana. El anticuerpo humano puede tener hasta veinte posiciones sustituidas con residuos de aminoácido que no forman parte de la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana. En otras formas de realización, hay hasta diez, hasta cinco, hasta tres o hasta dos posiciones sustituidas. En una forma de realización, estas sustituciones se encuentran dentro de las regiones CDR. No obstante, la expresión «anticuerpo humano», tal como se usa en el presente documento, no incluirá anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR obtenidas a partir de la línea germinal de otra especie de mamífero, como por ejemplo un ratón, en secuencias estructurales humanas.

[0031] La expresión «enfoque de mutagénesis selectiva» incluye un procedimiento para mejorar la actividad de un anticuerpo seleccionando y mutando individualmente aminoácidos de la CDR al menos una posición de mutagénesis selectiva, hipermutación y/o posición de contacto adecuadas. Un anticuerpo humano «mutado selectivamente» es un anticuerpo que comprende una mutación en una posición seleccionada usando un enfoque de mutagénesis selectiva. En otro aspecto, el enfoque de mutagénesis selectiva está concebido para proporcionar un procedimiento para mutar preferentemente residuos de aminoácido individuales seleccionados en la CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de la cadena pesada (en lo sucesivo denominadas H1, H2 y H3, respectivamente), o la CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de la cadena ligera (en lo sucesivo denominadas L1, L2 y L3, respectivamente) de un anticuerpo. Se pueden seleccionar residuos de aminoácido a partir de posiciones de mutagénesis selectiva, posiciones de contacto o posiciones de hipermutación. Los aminoácidos individuales se seleccionan en función de su posición en la región variable de la cadena ligera o pesada. Debe entenderse que una posición de hipermutación también puede ser una posición de contacto. En un aspecto, el enfoque de mutagénesis selectiva es un «enfoque dirigido». Se entenderá que la expresión «enfoque dirigido» incluye un procedimiento para mutar residuos de aminoácido individuales seleccionados en la CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de la cadena pesada o la CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo de manera dirigida, por ejemplo, un «enfoque dirigido a un grupo específico» o «enfoque dirigido a una CDR específica». En el «enfoque dirigido a un grupo específico», se marcan como objetivo residuos de aminoácido individuales en grupos concretos para llevar a

cabo mutaciones selectivas en los que se incluyen grupos I (incluidas L3 y H3), II (incluidas H2 y L1) y III (incluidas L2 y H1), según el orden de preferencia de los grupos como objetivo. En el «enfoque dirigido a una CDR específica», se marcan como objetivo residuos de aminoácido individuales en CDR concretas para llevar a cabo mutaciones selectivas con el siguiente orden de preferencia como objetivo: H3, L3, H2, L1, H1 y L2. El residuo de aminoácido seleccionado se muta, por ejemplo, en al menos otros dos residuos de aminoácido, y se determina el efecto de la mutación sobre la actividad del anticuerpo. La actividad se mide como un cambio en la especificidad/afinidad de unión del anticuerpo, y/o la potencia de neutralización del anticuerpo. Debe entenderse que el enfoque de mutagénesis selectiva se puede usar para la optimización de cualquier anticuerpo obtenido a partir de cualquier fuente, entre ellas: expresión en fagos, animales transgénicos con genes de línea germinal de IgG humanos, anticuerpos humanos aislados a partir de células B humanas. El enfoque de mutagénesis selectiva se puede usar en anticuerpos que se pueden optimizar más mediante la tecnología de expresión en fagos. Debe entenderse que los anticuerpos procedentes de cualquier fuente, incluida la expresión en fagos, animales transgénicos con genes de línea germinal de IgG humanos y anticuerpos humanos aislados a partir de células B humanas, pueden someterse a una mutación inversa antes o después del enfoque de mutagénesis selectiva.

15 **[0032]** La expresión «anticuerpo humano recombinante» incluye anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados mediante un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados a partir de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes, anticuerpos aislados a partir de un animal (p. ej., un ratón) transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, p. ej., Taylor, L. D., y col. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por otros medios cualesquiera que conlleven el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes poseen regiones variables y constantes originadas a partir de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (véase, Kabat, E. A. y col. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación del NIH n.º 91-3242). No obstante, en ciertas formas de realización, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a una mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática in vivo) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se originan a partir de secuencias de VH y VL de línea germinal humana relacionadas, podrían no existir de manera natural en el repertorio in vivo de la línea germinal de anticuerpos humanos. No obstante, en ciertas formas de realización, dichos anticuerpos recombinantes son el resultado de un enfoque de mutagénesis selectiva, o de una mutación inversa o de ambas.

35 **[0033]** Un «anticuerpo aislado» incluye un anticuerpo sustancialmente exento de otros anticuerpos con diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a la hIL-12 está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos a la hIL-12). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la hIL-12 puede unirse a moléculas de IL-12 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o sustancias químicas. En la patente de EE. UU. n.º 6.914.128, se describen anticuerpos anti-IL-12 adecuados que se pueden purificar en el contexto de la presente invención, e incluyen, entre otros, el anticuerpo anti-IL-12 identificado en dicha patente como J695, y que posteriormente ha sido identificado como ABT-874. En los documentos USSN 09/780.035 y 10/988.360, se describen anticuerpos anti-IL-18 adecuados que se pueden purificar y aislar en el contexto de la presente invención, e incluyen, el anticuerpo que posteriormente ha sido identificado como ABT-325. Un anticuerpo anti-TNF α adecuado es el Adalimumab (Abbott Laboratories).

45 **[0034]** Un «anticuerpo neutralizante» (o un «anticuerpo que neutralizó la actividad de la hIL-12») incluye un anticuerpo cuya unión a la hIL-12 da lugar a la inhibición de la actividad biológica de la hIL-12. Esta inhibición de la actividad biológica de la hIL-12 se puede determinar midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de la hIL-12, como por ejemplo la inhibición de la proliferación de blastocitos con fitohemaglutinina humana en un análisis de proliferación de blastocitos con fitohemaglutinina (PHA), o la inhibición de la unión al receptor en un ensayo de unión al receptor de la IL-12 humana. Estos indicadores de la actividad biológica de la hIL-12 se pueden determinar mediante uno más de los diversos ensayos in vitro o in vivo conocidos en la técnica.

55 **[0035]** Un «anticuerpo neutralizante» (o un «anticuerpo que neutralizó la actividad de la hIL-18») incluye un anticuerpo cuya unión a la hIL-18 da lugar a la inhibición de la actividad biológica de la hIL-18. Esta inhibición de la actividad biológica de la hIL-18 se puede determinar midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de la hIL-18, como por ejemplo la inducción de la producción de IFN γ por parte de células T o células NK, o la inhibición de la unión al receptor de la IL-18 humana en un ensayo de unión al receptor de la IL-18 humana. Estos indicadores de la actividad biológica de la hIL-18 se pueden determinar mediante uno más de los diversos ensayos in vitro o in vivo.

vivo conocidos en la técnica.

- [0036]** El término «actividad» incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo para un antígeno, p. ej., un anticuerpo anti-hIL-12 que se une a un antígeno IL-12 y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo anti-hIL-12 cuya unión a la hIL-12 inhibe la actividad biológica de la hIL-12, p. ej., la inhibición de la proliferación de blastocitos PHA o la inhibición de la unión al receptor en un ensayo de unión al receptor de la IL-12 humana. El término «actividad» también incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo anti-IL-18 por su antígeno, p. ej., un anticuerpo anti-IL-18 que se une a un antígeno IL-18 y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo anti-IL-18 cuya unión a la hIL-18 inhibe la actividad biológica de la hIL-18. El término «actividad» también incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo anti-TNF α por su antígeno, p. ej., un anticuerpo anti-TNF α que se une a un antígeno TNF α y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo anti-TNF α cuya unión al hTNF α inhibe la actividad biológica de la hTNF α .
- 15 **[0037]** La expresión «resonancia de plasmones superficiales» incluye un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensores, p. ej., usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N. J.). Para conocer otras descripciones, consulte los siguientes documentos: Jonsson, U., y col. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jonsson, U., y col. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., y col. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; y Johnsson, B., y col. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.
- 20 **[0038]** El término «K_{off}» se usa en el presente documento para hacer referencia a la constante de disociación (*off-rate*) para la disociación de un anticuerpo a partir del complejo anticuerpo/antígeno.
- 25 **[0039]** El término «K_d» se usa en el presente documento para hacer referencia a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta.
- [0040]** La expresión «molécula de ácido nucleico» incluye moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario, pero en un aspecto es ADN bicatenario.
- 30 **[0041]** La expresión «molécula de ácido nucleico aislada», tal como se usa en el presente documento, hace referencia a ácidos nucleicos que codifican, anticuerpos o porciones de anticuerpos (por ejemplo, VH, VL, CDR3), por ejemplo aquellos que se unen a la hIL-12, hTNF α o hIL-18, e incluye una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo o la porción de anticuerpo están exentas de otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpos que se unen a antígenos distintos de la hIL-12, hTNF α o hIL-18, y dichas otras secuencias pueden flanquear de manera natural el ácido nucleico en el ADN genómico humano. Por tanto, p. ej., un ácido nucleico aislado de la invención que codifica una región VH de un anticuerpo anti-IL-12, anti-TNF α o anti-IL-18 no contiene otras secuencias que codifiquen otras regiones VH que se unan a antígenos distintos a, por ejemplo, IL-12, hTNF α o hIL-18. La expresión «molécula de ácido nucleico aislada» también se entenderá que incluye secuencias que codifican anticuerpos específicos bivalentes, tales como diacuerpos en los que las regiones VH y VL no contienen secuencias distintas a las secuencias del diacuerpo.
- 35 **[0042]** La expresión «célula huésped recombinante» (o simplemente «célula huésped») incluye una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichos términos no solo hacen referencia a la célula concreta sometida a esta operación, sino también a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas a causa de mutaciones o influencias del entorno, dicha descendencia, de hecho, puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero aun así se engloba en la expresión «célula huésped», tal como se usa en el presente documento.
- 45 **[0043]** El término «modificador», tal como se usa en el presente documento, se entenderá que hace referencia al cambio de uno o más aminoácidos en el anticuerpo o en sus porciones de unión al antígeno. El cambio se puede producir añadiendo, sustituyendo o eliminando un aminoácido en una o más posiciones. El cambio se puede producir mediante el uso de técnicas conocidas, como la mutagénesis por PCR.
- 50 **[0044]** El término «aproximadamente», tal como se usa en el presente documento, se entenderá que hace referencia a intervalos aproximadamente un 10-20% más grande o más pequeño que el valor de referencia. En ciertas circunstancias, un experto en la materia reconocerá que, debido a las características intrínsecas del valor de referencia, el término «aproximadamente» puede significar un entorno mayor o menor que una desviación de dicho valor del 10-20%.

- [0045] La expresión «reducción/inactivación vírica», tal como se usa en el presente documento, se entenderá que hace referencia a una disminución en el número de partículas víricas en una muestra concreta («reducción»), así como a una disminución en la actividad, por ejemplo, pero no exclusivamente, la infecciosidad o capacidad de replicación de partículas víricas en una muestra concreta («inactivación»). Dichas disminuciones en el número y/o la actividad de las partículas víricas pueden ser del orden del 1% al 99%, preferentemente del 20% al 99%, más preferentemente del 30% al 99%, más preferentemente del 40% al 99%, todavía más preferentemente del 50% al 99%, todavía más preferentemente del 60% al 99%, aún más preferentemente del 70% al 99%, aún más preferentemente del 80% al 99%, y aún más preferentemente del 90% al 99%. En ciertas formas de realización no exclusivas, la cantidad de virus, si los hay, en el producto de anticuerpo purificado es menor que la ID50 (la cantidad de virus necesaria para infectar al 50% de una población objeto de estudio) para ese virus, preferentemente al menos 10 veces menor que la ID50 para ese virus, más preferentemente al menos 100 veces menor que la ID50 para ese virus, y aún más preferentemente al menos 1000 veces menos que la ID50 para ese virus.
- [0046] La expresión «posición de contacto» incluye una posición de aminoácido en la CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera de un anticuerpo que está ocupada por un aminoácido que entra en contacto con el antígeno en una de las veintiséis estructuras anticuerpo-antígeno conocidas. Si un aminoácido de la CDR en cualquiera de las veintiséis estructuras resueltas conocidas de complejos anticuerpo-antígeno entra en contacto con el antígeno, entonces se puede considerar que ese aminoácido ocupa una posición de contacto. Las posiciones de contacto tienen una mayor probabilidad de ser ocupadas por un aminoácido que entre en contacto con antígenos que las posiciones que no son de contacto. En un aspecto, una posición de contacto es una posición en la CDR que contiene un aminoácido que entra en contacto con el antígeno en más de 3 de las 26 estructuras (<1,5%). En otro aspecto, una posición de contacto es una posición en la CDR que contiene un aminoácido que entra en contacto con el antígeno en más de 8 de las 25 estructuras (>32%).

2. Generación de anticuerpos

- [0047] El término «anticuerpo», tal como se usa en el presente apartado, hace referencia a un anticuerpo intacto o a un fragmento del mismo de unión al antígeno.

- [0048] Los anticuerpos de la presente descripción se pueden generar mediante diversas técnicas, incluida la inmunización de un animal con el antígeno de interés seguida de metodologías convencionales de anticuerpos monoclonales, p. ej., la técnica de hibridación celular somática de Kohler y Milstein (1075) *Nature* 256:495. Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación celular somática, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir el anticuerpo monoclonal, p. ej., la transformación vírica u oncogénica de linfocitos B.

- [0049] Un sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas constituye un procedimiento muy bien establecido. En la técnica se conocen protocolos de inmunización y técnicas para el aislamiento de esplenocitos para la fusión. También se conocen parejas de fusión (p. ej., células de mieloma murinas) y procedimientos de fusión.

- [0050] Un anticuerpo puede ser preferentemente un anticuerpo humano, un anticuerpo híbrido o un anticuerpo humanizado. Se pueden preparar anticuerpos híbridos o humanizados de la presente descripción basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado del modo descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadenas pesadas y ligeras se puede obtener a partir del hibridoma no humano de interés y se pueden manipular para que contengan secuencias de inmunoglobulina no murina (p. ej., humana) mediante el uso de técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo híbrido, se pueden ligar regiones variables murinas a regiones constantes humanas mediante el uso de procedimientos conocidos en la técnica (véase, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 4.816.567 de Calibilly y col.) para crear un anticuerpo humanizado, se pueden insertar regiones CDR murinas en una estructura humana usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 5.225.539 de Winter, y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen y col.).

- [0051] En una forma de realización no exclusiva, los anticuerpos de la presente descripción son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra la IL-12, TNF α o IL-18 se pueden generar mediante el uso de ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmune humano en lugar de las del sistema inmune del ratón. Entre estos ratones transgénicos y transcromosómicos se incluyen ratones a los que se hace referencia en el presente documento como el HumAb Mouse® (Medarex, Inc.), KM Mouse® (Medarex, Inc.), y Xenomouse® (Amgen).

- [0052]** Además, en la técnica hay disponibles sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y se pueden usar para generar anticuerpos de la descripción, como por ejemplo anticuerpos anti-IL-12, anti-TNF α o anti-IL-18. Por ejemplo, se pueden usar ratones que portan tanto un transcromosoma humano de cadena pesada como un transcromosoma humano de cadena ligera, denominados «ratones TC»; dichos ratones fueron descritos por Tomizuka y col. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, en la técnica se han descrito vacas portadoras de transcromosomas humanos de cadena pesada y ligera (p. ej., Kuroiwa y col. (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894 y la solicitud PCT n.º WO 2002/092812) y se pueden usar para generar anticuerpos anti-IL-12, anti-TNF α o anti-IL-18 de la presente descripción.
- [0053]** Se pueden aislar anticuerpos recombinantes humanos de la invención, incluidos, entre otros, anticuerpos anti-IL-12, anti-TNF α o anti-IL-18 o sus porciones de unión al antígeno, o anticuerpos relacionados con anti-IL-12, relacionados con anti-TNF α o relacionados con anti-IL-18 descritos en el presente documento, mediante la criba de una biblioteca combinatoria y recombinante de anticuerpos, p. ej., una biblioteca de expresión en fagos scFv, preparada con cADN humanos VL y VH preparados a partir de mRNA procedente de linfocitos humanos. En la técnica se conocen metodologías para preparar y cribar dichas bibliotecas. Además, de los kits disponibles en el mercado para generar bibliotecas de expresión en fagos (p. ej., el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, n.º de catálogo 27-9400-01; y el kit de expresión en fagos Stratagene SurfZARTM, n.º de catálogo 240612), se pueden encontrar ejemplos de procedimientos y reactivos particularmente aptos para su uso en la generación y criba de bibliotecas de anticuerpos en, p. ej.: la patente de EE. UU. n.º 5.223.409 de Ladner y col.; la publicación PCT n.º WO 92/18619 de Kang y col.; la publicación PCT n.º WO 91/17271 de Dower y col.; la publicación PCT n.º WO 92/20791 de Winter y col.; la publicación PCT n.º WO 92/15679 de Markland y col.; la publicación PCT n.º WO 93/01288 de Breitling y col.; la publicación PCT n.º WO 92/01047 McCafferty y col.; la publicación PCT n.º WO 92/09690 de Garrard y col.; Fuchs y col. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay y col. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse y col. (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty y col., *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths y col. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins y col. (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson y col. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram y col. (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard y col. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377, Hoogenboom y col. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; y Barbas y col. (1991) *PNAS* 88:7978-7982.
- [0054]** También se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos de la presente descripción mediante el uso de ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunes humanas, de manera que se pueda generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización.
- [0055]** En ciertas formas de realización, los procedimientos de la invención incluyen anticuerpos o porciones de anticuerpos anti-IL-12, anti-TNF α o anti-IL-18, anticuerpos o porciones de anticuerpos relacionados con anti-IL-12, relacionados con anti-TNF α o relacionados con anti-IL-18, y anticuerpos humanos o porciones de anticuerpos humanos con propiedades equivalentes a las de los anticuerpos anti-IL-12, anti-TNF α o anti-IL-18, como por ejemplo una alta afinidad de unión a la hIL-12, hTNF α o hIL-18 con una baja cinética de disociación y una elevada capacidad neutralizante. En un aspecto, la invención proporciona un tratamiento con un anticuerpo humano aislado, o una porción del mismo de unión al antígeno, que se disocia de la hIL-12, hTNF α o hIL-18 con una K_d de aproximadamente 1×10^{-8} M o menos y una constante de disociación K_{off} de 1×10^{-3} s $^{-1}$ o menos, ambas determinadas mediante resonancia de plasmones de superficie. En formas de realización concretas no exclusivas, un anticuerpo anti-IL-12 purificado de acuerdo con la invención inhibe competitivamente la unión de ABT-874 a la IL-12 en condiciones fisiológicas. En formas de realización concretas no exclusivas, un anticuerpo anti-TNF α purificado de acuerdo con la invención inhibe competitivamente la unión de Adalimumab al TNF α en condiciones fisiológicas.
- [0056]** En otra forma de realización más de la invención, se pueden alterar anticuerpos o fragmentos de los mismos, como por ejemplo, entre otros, anticuerpos anti-IL-12, anti-TNF α o anti-IL-18 o fragmentos de los mismos, de manera que se modifique la región constante del anticuerpo para reducir al menos una función de efector biológico mediada por la región constante, con respecto a un anticuerpo no modificado. Para modificar un anticuerpo de la invención de manera que muestre una reducción en la unión al receptor Fc, el segmento de región constante de la inmunoglobulina del anticuerpo se puede mutar en regiones concretas necesarias para las interacciones con el receptor Fc (FcR) (véase, p. ej., Canfield y Morrison (1991) *J. Exp. Med.* 173:1483-1491; y Lund y col. (1991) *J. of Immunol.* 147:2657-2662). La reducción en la capacidad de unión al FcR también puede reducir otras funciones efectoras que dependen de interacciones con FcR, tales como la opsonización y la fagocitosis y la citotoxicidad celular dependiente del antígeno.

3. Producción de Anticuerpos

[0057] Para expresar un anticuerpo de la invención, se insertan ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o completas en uno o más vectores de expresión, de manera que los genes estén ligados operativamente a secuencias de control transcripcional y traduccional. (Véase, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 6914.128) En este contexto, se entenderá que la expresión «ligado operativamente» significa que un gen del anticuerpo está ligado a un vector de manera que las secuencias transcripcionales y traduccionales contenidas en el vector cumplan su función prevista de regulación de la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se escogen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en un vector de expresión distinto o, más habitualmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.

Los genes del anticuerpo se insertan en un vector de expresión mediante procedimientos convencionales (p. ej., ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen y el vector del anticuerpo, o ligadura del extremo romo si no hay ningún sitio de restricción presente). Antes de insertar el anticuerpo o secuencias de cadena ligera o pesada relacionadas con el anticuerpo, el vector de expresión puede portar previamente secuencias de la región constante del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque para convertir el anticuerpo anti-IL-12, anti-TNF α o anti-IL-18 o secuencias de VH y VL relacionadas con el anticuerpo anti-IL-12, anti-TNF α o anti-IL-18 en genes de anticuerpo de tamaño completo consiste en insertarlas en vectores de expresión que ya están codificando las regiones constantes de cadena pesada y de cadena ligera, respectivamente, de manera que el segmento VH quede ligado operativamente al segmento o segmentos CH contenidos en el vector y el segmento VL está ligado operativamente al segmento CL contenido en el vector. Además, o como otra posibilidad, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector de manera que el péptido señal esté ligado en marco al término amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal procedente de una proteína no inmunoglobulínica).

[0058] Además de los genes de cadena de anticuerpo, un vector de expresión recombinante de la invención puede portar una o más secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. La expresión «secuencia reguladora» se entiende que incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, p. ej., en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Los expertos en la materia observarán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Entre las secuencias reguladoras adecuadas para la expresión en células huésped de mamífero se incluyen elementos víricos que dirigen niveles elevados de expresión de proteína en células de mamíferos, de manera que promotores y/o potenciadores obtenidos a partir de citomegalovirus (CMV) (Como por ejemplo el promotor/potenciadores de CMV), virus de simio 40 (Simian Virus 40 o SV40) (como por ejemplo el promotor/potenciadores SV40), adenovirus (p. ej., el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP)) y poliovirus. Para una descripción más amplia de elementos víricos reguladores y sus secuencias, véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.168.062 de Stinski, la patente de EE. UU. n.º 4.510.245 de Bell y col. Y la patente de EE. UU. n.º 4.968.615 de Schaffner y col.

[0059] Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, un vector de expresión recombinante de la invención puede portar una o más secuencias adicionales, como por ejemplo una secuencia que regula la replicación del vector en células huésped (p. ej., orígenes de replicación) y/o gen marcador seleccionable. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas ellas de Axel y col). Por ejemplo, el gen marcador seleccionable normalmente confiere resistencia a los fármacos, como por ejemplo G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido un vector. Los genes marcadores seleccionables adecuados incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr- con selección/amplificación con metotrexato) y el neogén (para la selección de G418).

[0060] Un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención se puede preparar mediante la expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, se transfecta una célula huésped con uno o más vectores de expresión portadores de fragmentos de ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas de la inmunoglobulina del anticuerpo, de manera que las cadenas ligeras y pesadas se expresen en la célula huésped y se secreten en el medio en el que se cultivan las células huésped, y, a partir de dicho medio, se pueden recuperar los anticuerpos. Se usan metodologías convencionales de ADN recombinante para obtener genes de cadena ligera y pesada de anticuerpos, incorporar estos genes en

vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células huésped, tal como se describe en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds.), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel y col. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) y en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.816.397 y 6.914.128.

5

[0061] Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, se transfecta o transfectan mediante técnicas convencionales el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras una célula huésped. Se entenderá que las diversas formas del término «transfección» abarcan una amplia variedad de técnicas usadas habitualmente para la introducción de DNA exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, p. ej.,
 10 electroporación, precipitación calcio-fosfato, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención tanto en células procariotas como eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, como por ejemplo células huésped de mamífero, resulta adecuada debido a que dichas células eucariotas, y en particular las células de mamífero, tienen más probabilidad de ensamblar y secretar un anticuerpo plegado correctamente e inmunológicamente activo que las células eucariotas. Existen informes que
 15 indican que la expresión procariota de genes de anticuerpos resulta ineficaz para dar lugar a un alto rendimiento de producción de anticuerpo activo (Boss y Wood (1985) *Immunology Today* 6:12-13,). Las células procariotas, de levaduras o de eucariotas superiores descritas anteriormente constituyen células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores que se describen en el presente documento. Entre las procariotas adecuadas para este fin, se incluyen eubacterias, como por ejemplo organismos gramnegativos o grampositivos, p.
 20 ej., enterobacterias como *Escherichia*, p. ej., *E. coli*, enterobacterias, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p. ej., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p. ej., *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (p. ej., *licheniformis* 41, descrito en el documento DD 266.710, publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped adecuado para la clonación de *E. coli* es la *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque existen otras cepas adecuadas, como por ejemplo la *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC
 25 31.537), y la *E. coli* W3110 (ATC 27.325). Estos ejemplos tienen un carácter ilustrativo y no excluyente.

[0062] Además de las procariotas, microbios eucariotas tales como hongos o levaduras filamentosas resultan adecuados como huéspedes de clonación o expresión para vectores de codificación de polipéptidos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de cerveza, es el más usado de los microorganismos huésped eucariotas
 30 inferiores. No obstante, existen diversos géneros, especies y cepas disponibles comúnmente en el mercado y que resultan útiles en este caso, como por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes *Kluyveromyces* tales como, p. ej., *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 2440.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, p. ej., huéspedes *Neurospora*, *Penicillium*,
 35 *Tolypocladium*, y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

[0063] Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos glucosilados proceden de organismos pluricelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de plantas y células de insectos.
 40 Se han identificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y las correspondientes células huésped permisivas de insecto procedentes de huéspedes como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Existen diversas cepas víricas disponibles en el mercado para llevar a cabo la transfección, p. ej., la variante L-1 del NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 del NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus se pueden usar como virus de la presente descripción de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.
 45 También se pueden utilizar como huéspedes cultivos celulares de plantas de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

[0064] Entre las células huésped de mamífero adecuadas para expresar los anticuerpos recombinantes de la
 50 invención, se incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas las células CHO dhfr-, descritas por Urlaub y Chasin, (1980) *PNAS USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador DHFR seleccionable, tal como, p. ej., describen Kaufman y Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente
 55 para permitir que se produzca la expresión del anticuerpo en las células huésped o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero son: la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o 293 células subclonadas para el crecimiento en un cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células renales de hámster neonato (BHK, ATCC CCL 10); células ováricas de hámster

chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); hepatocitos de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); hepatocitos humanos (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0065] Se transforman células huésped con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutritivos convencionales, con las modificaciones adecuadas para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias que se desean obtener.

[0066] Las células huésped usadas para producir un anticuerpo se pueden cultivar en diversos medios. Modelos disponibles en el mercado, como Ham's F10™ (Sigma), Minimal Essential Medium™ ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma)), y Dulbecco's Modified Eagle's Medium™ ((DMEM), Sigma) resultan adecuados para cultivar las células huésped. Además, como medio de cultivo para las células huésped se puede usar cualquiera de los medios descritos por Ham y col., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes y col., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), y en las patentes de EE. UU. n. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; las patentes WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente de EE. UU. n.º Re. 30.985.

[0067] Cualquiera de estos medios se puede complementar, si fuera necesario, con hormonas y/u otros factores del crecimiento (como, por ejemplo, insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como, por ejemplo, cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones, (como HEPES), nucleótidos (como, por ejemplo, adenosina y timidina), antibióticos (como, por ejemplo, gentamicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos que suelen estar presentes en concentraciones finales a escala micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario en concentraciones apropiadas, que ya conocerán los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, como por ejemplo la temperatura, el pH y similares son las mismas que se han usado anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y son evidentes para los técnicos expertos en la materia.

[0068] También se pueden usar células huésped para producir porciones de anticuerpos, como por ejemplo fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entiende que las variaciones sobre el anterior procedimiento caen dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, puede ser conveniente transfectar una célula huésped con ADN que codifica la cadena ligera o bien la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de la presente invención. También se puede usar tecnología de ADN recombinante para eliminar todo o parte del ADN que codifica las cadenas ligera o pesada, o ambas, que no sea necesario para unirse a la IL-12, específicamente hIL-12, en el contexto de los anticuerpos anti-IL-12, o el ADN que no sea necesario para unirse a la IL-18, específicamente hIL-18, en el contexto de los anticuerpos anti-IL-18, o el ADN que no sea necesario para unirse a la TNF α , específicamente hTNF α , en el contexto de los anticuerpos anti-TNF α . Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas también están englobadas en los anticuerpos de la invención. Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y otra ligera constituyen un anticuerpo de la invención y las otras cadenas pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto a la IL-12, TNF α , o IL-18, dependiendo de la especificidad del anticuerpo de la invención, por medio del entrecruzamiento de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo mediante procedimientos de entrecruzamiento químico.

[0069] En un sistema adecuado para la expresión recombinante de un anticuerpo, o una parte del mismo de unión al antígeno, de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células dhfr-CHO mediante una transfección mediada por fosfato cálcico. Dentro del vector de expresión recombinante, cada uno de los genes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo está ligado operativamente a elementos reguladores potenciador CMV/promotor AdMLP para inducir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite seleccionar las células CHO que han sido transfectadas con el vector mediante una selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y se recupera el anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se utilizan técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar las transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.

[0070] Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir de forma intracelular, en el espacio periplasmático, o se puede secretar directamente en el medio. En un aspecto, si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, el residuo particulado, tanto células huésped como células lisadas (p. ej., resultantes de la homogeneización), se puede eliminar, p. ej., mediante centrifugado o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, primero se pueden concentrar los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión por medio de un filtro de proteínas disponible en el mercado, p. ej., una unidad de ultrafiltración Amicon™ o Millipore Pellicon™.

[0071] Antes del procedimiento de la invención, los procedimientos para la purificación de anticuerpos a partir de residuos celulares dependen inicialmente del sitio de expresión del anticuerpo. Algunos anticuerpos se pueden secretar directamente en el medio de cultivo circundante; otros se introducen intracelularmente. Para estos últimos anticuerpos, la primera etapa de un procedimiento de purificación suele incluir: lisis de la célula, que se puede llevar a cabo mediante diversos procedimientos, que incluyen cizallamiento mecánico, choque osmótico o tratamientos enzimáticos. Dicha ruptura libera todo el contenido de la célula en el homogeneizado, y además produce fragmentos subcelulares que son difíciles de eliminar debido a su pequeño tamaño. Por lo general, estas se eliminan mediante centrifugado diferencial o mediante filtración. En los casos en los que el anticuerpo es secretado, por lo general se concentran primero sobrenadantes de dichos sistemas de expresión usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, p. ej., una unidad de ultrafiltración Amicon™ o Millipore Pellicon™. En los casos en los que el anticuerpo se secreta dentro del medio, las células huésped recombinantes también se pueden separar del medio de cultivo celular, p. ej., mediante filtración de flujo tangencial. Se pueden continuar recuperando anticuerpos del medio de cultivo mediante los procedimientos de purificación de anticuerpos de la invención.

4. Purificación de anticuerpos

4.1 Purificación general de anticuerpos

[0072] La invención proporciona un procedimiento para la producción de un preparado de anticuerpos purificado (o «con un nivel reducido de HCP») a partir de una mezcla que comprende un anticuerpo y al menos una HCP. El procedimiento de purificación de la invención comienza en la etapa de separación, cuando se ha producido el anticuerpo mediante procedimientos descritos anteriormente y procedimientos convencionales de la técnica. La tabla 1 resume una forma de realización de un programa de purificación.

Tabla 1. Etapas de purificación con sus objetivos

Etapas de purificación	Objetivo
Recuperación primaria	Clarificación de la matriz de muestra
Cromatografía de afinidad	Captura de anticuerpos, reducción de proteína de célula huésped e impurezas relacionadas
Cromatografía de intercambio catiónico	Captura de anticuerpos, reducción de proteína de célula huésped e impurezas relacionadas
Ultrafiltración/diafiltración	Concentración e intercambio de tampón
Cromatografía de intercambio aniónico	Reducción de proteínas de célula huésped y ADN
Cromatografía de alta resolución con Phenyl Sepharose™	Reducción de agregados de anticuerpos y proteínas de célula huésped
Filtración de virus	Eliminación de grandes virus, si los hay
Ultrafiltración/diafiltración final	Concentración y formulación del anticuerpo

[0073] Una vez que se ha obtenido una solución o mezcla clarificada que comprende el anticuerpo, la separación del anticuerpo de las otras proteínas producidas por la célula, como las HCP, se lleva a cabo por medio de una combinación de diferentes técnicas de purificación, incluida una etapa (o etapas) de separación por intercambio iónico y una etapa (o etapas) de separación por interacción hidrófoba. Las etapas de separación separan mezclas de proteínas en función de su carga, grado de hidrofobia, o tamaño. En un aspecto de la invención, la separación se lleva a cabo mediante cromatografía, incluidas la cromatografía catiónica, aniónica y de interacción hidrófoba. Hay varias resinas cromatográficas diferentes disponibles para cada una de estas técnicas, que permiten adaptar con precisión el programa de purificación a la proteína concreta con la que se está trabajando. El fundamento de cada uno de los procedimientos de separación consiste en que se puede hacer que las proteínas desciendan por una

columna a diferentes velocidades, con lo que se logra una separación física que aumenta a medida que avanzan hacia la parte inferior de la columna, o que se adhieran selectivamente al medio de separación, eluyéndose a continuación con distintos disolventes. En algunos casos, el anticuerpo se separa de las impurezas cuando las impurezas se adhieren específicamente a la columna y el anticuerpo no se adhiere, es decir, el anticuerpo está presente en la fracción no retenida (*flow through*).

[0074] Como se indica anteriormente, la adaptación precisa de un programa de purificación se basa en la consideración de la proteína que se va a purificar. En ciertas formas de realización, las etapas de separación de la presente invención se emplean para separar un anticuerpo de una o más HCP. Los anticuerpos que se pueden purificar correctamente mediante los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen, entre otros: los anticuerpos humanos IgA₁, IgA₂, IgD, IgE, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ e IgM. En ciertas formas de realización, las estrategias de purificación de la presente invención excluyen el uso de la cromatografía de afinidad con proteína A, por ejemplo en el contexto de la purificación de anticuerpos IgG₃, ya que los anticuerpos IgG₃ se unen a la proteína A de manera ineficiente. Otros factores que permiten adaptar específicamente un programa de purificación incluyen, entre otros: la presencia o ausencia de una región Fc (p. ej., en el contexto del anticuerpo completo en comparación con un fragmento Fab del mismo), debido a que la proteína A se une a la región Fc; las secuencias concretas de la línea germinal empleadas para generar el anticuerpo de interés; y la composición de aminoácidos del anticuerpo (p. ej., la secuencia principal del anticuerpo, así como la carga/hidrofobia total de la molécula). Se pueden purificar anticuerpos que comparten una o más características mediante estrategias de purificación especialmente adaptadas para aprovechar dichas características.

4.2 Recuperación primaria

[0075] Las etapas iniciales de los procedimientos de purificación de la presente invención incluyen la primera fase de clarificación y recuperación primaria de anticuerpo a partir de una matriz de muestra. Además, el procedimiento de recuperación primaria también puede constituir un punto en el que se reducen o inactivan los virus que puedan estar presentes en la matriz de muestra. Por ejemplo, se puede usar uno o más cualesquiera de entre diversos procedimientos de reducción/inactivación vírica durante la fase de recuperación primaria de la purificación, incluidos: inactivación térmica (pasteurización), inactivación por pH, tratamiento con disolvente/detergente, irradiación con rayos UV y γ , y la adición de ciertos agentes químicos de inactivación tales como β -propiolactona o, p. ej., un complejo de cobre y fenantrolina según la patente de EE. UU. n.º 4.534.972. En ciertas formas de realización de la presente invención, la matriz de muestra se expone a una reducción/inactivación vírica por pH durante la fase de recuperación primaria.

[0076] Los procedimientos de reducción/inactivación de virus por pH incluyen, entre otros, la incubación de la mezcla durante un periodo de tiempo a un pH bajo y, posteriormente, la neutralización del pH y la eliminación de particulados mediante filtración. En ciertas formas de realización, la mezcla se incubará a un pH de entre 2 y 5, preferentemente a un pH de entre 3 y 4, y más preferentemente a un pH de 3,5. El pH de la matriz de muestra se puede rebajar con cualquier ácido adecuado, entre los que se incluyen: ácido cítrico, ácido acético, ácido caprílico u otros ácidos adecuados. La elección del nivel de pH depende del perfil de estabilidad del producto del anticuerpo y los componentes tamponadores. Es sabido que la calidad del anticuerpo diana durante la reducción/inactivación de virus con pH bajo se ve afectada por el pH y la duración de la incubación a pH bajo. En ciertas formas de realización, la duración de la incubación a pH bajo será de 0,5 a 2 horas, preferentemente de 0,5 a 1,5 horas, y más preferentemente la duración será de 1 hora. La reducción/inactivación vírica depende de estos mismos parámetros además de la concentración de proteína, que puede limitar la reducción/inactivación a altas concentraciones. Por tanto, se pueden seleccionar los parámetros de concentración de proteína, pH y duración de la reducción/inactivación apropiados para lograr el nivel deseado de reducción/inactivación vírica.

[0077] En ciertas formas de realización, la reducción/inactivación vírica se puede lograr a través del uso de filtros adecuados. Un ejemplo no exclusivo de filtro adecuado es el filtro Ultipor DV50™ de Pall Corporation. Aunque ciertas formas de realización de la presente invención emplean dicha filtración durante la fase de recuperación primaria, en otras formas de realización se emplea en otras fases del procedimiento de purificación, que incluyen, o bien la penúltima etapa, o bien la etapa final de purificación. En ciertas formas de realización, se emplean otros filtros para la reducción/inactivación vírica, tales como, entre otros: filtros Viresolve™ (Millipore, Billerica, Mass.); filtros Zeta Plus VR™ (CUNO; Meriden, Conn.); y filtros Planova™ (Asahi Kasei Pharma, Planova Division, Buffalo Grove, Ill.).

[0078] En los casos en los que se emplea la reducción/inactivación vírica, la mezcla de muestra se puede ajustar, según las necesidades, para posteriores etapas de purificación. Por ejemplo, tras la reducción/inactivación vírica a

pH bajo, se suele ajustar el pH de la mezcla de muestra hasta alcanzar un pH más neutro, p. ej., de 4,5 a 8,5, y preferentemente 4,9, antes de continuar con el procedimiento de purificación. Además, la mezcla se puede lavar con agua para inyección (WFI) para obtener una conductividad deseada.

5 **[0079]** En ciertas formas de realización, la recuperación primaria incluirá una o más etapas de centrifugado para clarificar aún más la matriz de muestra y, de este modo, ayudar a purificar los anticuerpos anti-IL-12, anti-TNF α , o anti-IL-18. El centrifugado de la muestra se puede llevar a cabo, por ejemplo, pero no exclusivamente, con una fuerza de 7000 xg a aproximadamente 12750 xg. En el contexto de una purificación a gran escala, dicho centrifugado se puede realizar en línea con un caudal ajustado para lograr, por ejemplo, pero no exclusivamente, un nivel de turbidez de 150 NTU en el sobrenadante obtenido. Dicho sobrenadante se puede recoger posteriormente para continuar la purificación.

15 **[0080]** En ciertas formas de realización, la recuperación primaria incluirá el uso de una o más etapas de filtración de profundidad para aclarar aún más la matriz de muestra y, de este modo, ayudar a purificar los anticuerpos de la presente invención. Los filtros de profundidad contienen medios de filtración con una densidad gradual. Dicha densidad gradual permite que las partículas más grandes queden atrapadas cerca de la superficie del filtro, mientras que las partículas más pequeñas penetran por las zonas abiertas más grandes de la superficie del filtro, para acabar quedando atrapadas en las aberturas más pequeñas que se encuentran más próximas al centro del filtro. En ciertas formas de realización, la etapa de filtración de profundidad puede consistir en una etapa de filtración de profundidad con Delipid. Aunque ciertas formas de realización emplean etapas de filtración de profundidad únicamente durante la fase de recuperación primaria, otras formas de realización emplean filtros de profundidad, incluidos filtros de profundidad Delipid, durante una o más fases adicionales de purificación. Entre los ejemplos no exclusivos de filtros de profundidad que se pueden usar en el contexto de la presente invención, se incluyen los filtros de profundidad Cuno™ modelo 30/60ZA (3M Corp.), y cartuchos de filtro bicapa Sartopore™ de 0,45/0,2 μ m.

25

4.3 Cromatografía de afinidad

30 **[0081]** La muestra de recuperación primaria se somete a cromatografía de afinidad para continuar purificando el anticuerpo de interés eliminando las HCP. Se desvela que el material cromatográfico es capaz de unirse de manera selectiva o específica al anticuerpo de interés. Entre los ejemplos no exclusivos de dicho material cromatográfico se incluye: proteína A, proteína G, material cromatográfico que comprende el antígeno al que se une el anticuerpo de interés, y material cromatográfico que comprende una proteína de unión a Fc. La etapa de cromatografía de afinidad incluye el sometimiento de la muestra de recuperación primaria a una columna que comprende una resina de proteína A adecuada. La resina de proteína A resulta útil para el aislamiento y purificación por afinidad de diversos isotipos de anticuerpos, particularmente IgG₁, IgG₂, e IgG₄. La proteína A es una proteína de pared celular bacteriana que se une a las IgG de mamífero principalmente a través de sus regiones Fc. En su estado natural, la proteína A posee cinco dominios de unión a IgG, así como otros dominios cuya función se desconoce.

40 **[0082]** Existen varias fuentes comerciales de resina de proteína A. Una resina adecuada es la MabSelect™ de GE Healthcare. Un ejemplo no exclusivo de columna rellena con MabSelect™ adecuada es una columna de 1,0 cm de diámetro x 21,6 cm de longitud (volumen de lecho: ~17 mL). Este tamaño de columna se puede usar para purificaciones a pequeña escala y se puede comparar con otras columnas usadas para ampliaciones de escala. Por ejemplo, se puede usar una columna de 20 cm x 21 cm cuyo volumen de lecho es de 6,6 L para purificaciones a mayor escala. Independientemente de la columna, esta se puede rellenar con una resina adecuada como MabSelect™.

50 **[0083]** En ciertas formas de realización, resultará ventajoso identificar la capacidad de unión dinámica (DBC) de la resina de proteína A con el fin de adaptar la purificación al anticuerpo de interés en particular. A modo de ejemplo, pero no de limitación, la DCB de una columna MabSelect™ se puede determinar mediante una estrategia de carga de velocidad constante, o de dos velocidades. La carga de velocidad constante se puede evaluar a una velocidad de 300 cm/hora durante todo el periodo de carga. La estrategia de carga de dos velocidades se puede determinar cargando la columna con hasta 35 mg de proteína/mL de resina a una velocidad lineal de 300 cm/hora, y reduciendo después la velocidad lineal a la mitad para permitir un mayor tiempo de residencia para la última parte de la carga.

55 **[0084]** En ciertas formas de realización, la columna de proteína A se puede equilibrar con un tampón adecuado antes de cargar la muestra. Un ejemplo no exclusivo de tampón adecuado es un tampón Tris/NaCl, pH 7,2. Un ejemplo no exclusivo de condiciones de equilibrio adecuadas es Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,2. Una vez equilibrada, la muestra se puede cargar en la columna. Tras cargar la columna, esta se puede lavar una o varias veces con, p. ej., el tampón de equilibrio. Antes de eluir la columna, se pueden llevar a cabo otros lavados,

incluidos lavados en los que se emplean diferentes tampones. La columna se puede lavar con uno o más volúmenes de columna de ácido cítrico/citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M a un pH de 6,0. Este lavado puede venir seguido, opcionalmente, de uno o más lavados con el tampón de equilibrado. A continuación, se puede eluir la columna de proteína A con un tampón de elución apropiado. Un ejemplo no exclusivo de tampón de elución apropiado es un tampón de ácido acético/NaCl, pH 3,5. Condiciones apropiadas son, p. ej., ácido acético 0,1M, pH 3,5. Se puede realizar un seguimiento del eluido mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede seguir la absorbancia en OD₂₈₀. El eluido de la columna se puede recoger comenzando con una deflexión inicial de 0,5 UA hasta una lectura de 0,5 UA en el frente posterior del pico de elución. La fracción o fracciones de interés se pueden preparar para continuar el procesamiento. Por ejemplo, la muestra recogida se puede valorar hasta alcanzar un pH de 5,0 con Tris (p. ej., 1,0 M) a un pH de 10. Opcionalmente, esta muestra valorada se puede filtrar y seguir procesando.

4.4 Cromatografía de intercambio iónico

[0085] En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona procedimientos para producir una preparación de anticuerpos con un nivel reducido de HCP a partir de una mezcla que comprende un anticuerpo y al menos una HCP, mediante el sometimiento de la mezcla a al menos una etapa de separación por intercambio iónico, de manera que se obtiene un eluido que comprende el anticuerpo. La separación por intercambio iónico incluye cualquier procedimiento mediante el cual se separan dos sustancias basándose en la diferencia en sus respectivas cargas iónicas, y puede emplear, o bien material de intercambio catiónico, o bien material de intercambio aniónico.

[0086] El uso de un material de intercambio catiónico o de un material de intercambio aniónico viene dado por la carga total de la proteína. Por lo tanto, el empleo de una etapa de intercambio aniónico antes de una etapa de intercambio catiónico, o una etapa de intercambio catiónico antes de una etapa de intercambio aniónico queda dentro del alcance de la presente invención. Además, el empleo de una sola etapa de intercambio catiónico, una sola etapa de intercambio aniónico, o cualquier combinación en serie de las dos queda dentro del alcance de la presente invención.

[0087] Al llevar a cabo la separación, la mezcla inicial de anticuerpos se puede poner en contacto con el material de intercambio iónico mediante diversas técnicas, p. ej., mediante una técnica de purificación por lotes o una técnica cromatográfica.

[0088] Por ejemplo, en el contexto de la purificación por lotes, el material de intercambio iónico se prepara en, o se equilibra hasta, el tampón de partida que se desee. Tras la preparación, o equilibrado, se obtiene una suspensión acuosa del material de intercambio iónico. La solución del anticuerpo se pone en contacto con la suspensión acuosa para adsorber el anticuerpo que se va a separar al material de intercambio iónico. La solución que comprende la o las HCP que no se unen al material de intercambio iónico se separa de la suspensión acuosa, p. ej., permitiendo que la suspensión se asiente y retirando el sobrenadante. La suspensión acuosa se puede someter a una o más etapas de lavado. Si se desea, la suspensión acuosa se puede poner en contacto con una solución de mayor conductividad para desorber las HCO que se han unido al material de intercambio iónico. Para eluir polipéptidos unidos, se puede aumentar la concentración de sal del tampón.

[0089] También se puede usar la cromatografía de intercambio iónico como técnica de separación por intercambio iónico. La cromatografía de intercambio iónico separa las moléculas en función de las diferencias entre la carga total de las moléculas. Para la purificación de un anticuerpo, el anticuerpo debe tener una carga opuesta a la del grupo funcional fijado al material de intercambio iónico, p. ej., resina, para que se una. Por ejemplo, los anticuerpos, que tienen generalmente una carga total positiva en el pH de la solución tamponada inferior a su pI, se unirán bien a un material de intercambio iónico catiónico, que contiene grupos funcionales con carga negativa.

[0090] En la cromatografía de intercambio iónico, unas zonas cargadas situadas en la superficie del soluto son atraídas por cargas opuestas fijadas a una matriz cromatográfica, siempre que la fuerza iónica del tampón circundante sea baja. La elución se logra, generalmente, aumentando la fuerza iónica (es decir, la conductividad) del tampón para competir con el soluto por los sitios cargados de la matriz de intercambio iónico. Otra manera de lograr la elución del soluto consiste en cambiar el pH, y por tanto alterar la carga del soluto. El cambio en la conductividad o el pH puede ser gradual (elución en gradiente) o escalonado (elución escalonada).

[0091] Se pueden fijar grupos aniónicos o catiónicos a las matrices con el fin de formar soportes aniónicos o catiónicos para la cromatografía. Los ejemplos de grupos de intercambio aniónico incluyen, entre otros, grupos

dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amino cuaternario (Q). Entre los grupos catiónicos se incluye: carboximetilo (CM), sulfoetilo (SE), sulfopropilo (SP), fosfato (P) y sulfonato (S). Existen resinas celulósicas de intercambio iónico tales como DE23™, DE32™, DE52™, CM23™, CM-32™, y CM-52™ disponibles en Whatman Ltd. Maidstone, Kent, R. U. También se conocen intercambiadores iónicos basados en SEPHADEX® y –

- 5 locrosslinked. Por ejemplo, DEAE-, QAE-, CM-, y SP- SEPHADEX® y DEAE-, Q-, CMand S-SEPHAROSE® y SEPHAROSE® Fast Flow están todos disponibles en Pharmacia AB. Además, hay disponibles copolímeros de etilenglicol-metacrilato derivados tanto de DEAE como de CM, tales como TOYOPEARL™ DEAE-650S o M y TOYOPEARL™ CM650S o M, en Toso Haas Co., Filadelfia, Pa.
- 10 **[0092]** Una mezcla que comprende un anticuerpo e impurezas, p. ej., HCP, se carga en una columna de intercambio iónico, por ejemplo una columna de intercambio catiónico. Como ejemplo no exclusivo, la mezcla se puede cargar a una carga de 80 g de proteína/L de resina, dependiendo de la columna usada. Un ejemplo de columna de intercambio catiónico adecuada es una columna de 80 cm de diámetro x 23 cm de longitud cuyo volumen de lecho es 116 L. La mezcla cargada en esta columna catiónica se puede lavar posteriormente con un
- 15 tampón de lavado (tampón de equilibrado). A continuación, se eluye el anticuerpo de la columna, y se obtiene un primer eluido.

- [0093]** Esta etapa de intercambio iónico facilita la captura del anticuerpo de interés al tiempo que reduce impurezas tales como las HCP. En ciertos aspectos, la columna de intercambio iónico es una columna de
- 20 intercambio catiónico. Por ejemplo, pero no como limitación, una resina adecuada para dicha columna de intercambio catiónico es la resina CM HyperDF. Estas resinas están disponibles en el mercado, comercializadas por firmas como Pall Corporation. Este procedimiento de intercambio catiónico se puede llevar a cabo a temperatura ambiente o a una temperatura aproximada.

25 4.5 Ultrafiltración/diafiltración

- [0094]** Ciertas formas de realización de la presente invención emplean etapas de ultrafiltración y/o diafiltración para purificar y concentrar aún más la muestra de anticuerpo. La ultrafiltración se describe en detalle en: *Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications*, L. Zeman y A. Zydney (Marcel Dekker, Inc., Nueva York,
- 30 N.Y., 1996); y en: *Ultrafiltration Handbook*, Munir Cheryan (Technomic Publishing, 1986; ISBN n.º 87762-456-9). Un procedimiento de filtración preferido es la filtración de flujo tangencial descrita en el catálogo de Millipore titulado «Pharmaceutical Process Filtration Catalogue» págs. 177-202 (Bedford, Mass., 1995/96). Se considera que el término ultrafiltración hace referencia a una filtración en la que se emplean filtros con un tamaño de poro inferior a
- 35 0,1 µm. Mediante el empleo de filtros que poseen un tamaño de poro tan pequeño, se puede reducir el volumen de la muestra por medio de la permeación del tampón de muestra a través del filtro mientras los anticuerpos quedan retenidos tras el filtro.

- [0095]** La diafiltración es un procedimiento de uso de ultrafiltros para eliminar e intercambiar sales, azúcares y disolventes no acuosos, para separar las especies libres de las unidas, para eliminar material de bajo peso
- 40 molecular, y/o para provocar el cambio rápido de entornos de iónicos y/o de pH. Los microsolutos se eliminan de la manera más eficiente añadiendo disolvente a la solución que se está ultrafiltrando a una velocidad aproximadamente igual a la velocidad de ultrafiltración. De este modo se lavan microespecies de la solución a un volumen constante, con lo que se purifica eficazmente el anticuerpo retenido. En ciertas formas de realización de la presente invención,
- 45 se emplea una etapa de diafiltración para intercambiar los diversos tampones usados en relación con la presente invención, opcionalmente antes de posteriores etapas de cromatografía o purificación, así como para eliminar impurezas de las preparaciones de anticuerpos.

4.6 Cromatografía de interacción hidrófoba

- 50 **[0096]** En la presente memoria también se describen procedimientos para producir una preparación de anticuerpo con un nivel reducido de HCP que además comprende una etapa de separación por interacción hidrófoba. Por ejemplo, un primer eluido obtenido a partir de una columna de intercambio iónico se puede someter a un material de interacción hidrófoba de manera que se obtenga un segundo eluido con un nivel reducido de HCP. Las etapas de cromatografía de interacción hidrófoba, como las que se describen en la presente memoria, se llevan a cabo
- 55 generalmente para eliminar agregados de proteínas, como por ejemplo agregados de anticuerpos, e impurezas relacionadas con el proceso.

- [0097]** Al llevar a cabo la separación, la mezcla de muestra se pone en contacto con el material de la HIC, p. ej., mediante una técnica de purificación por lotes o mediante una columna. Antes de la purificación por HIC, puede

resultar conveniente eliminar todos los agentes caotrópicos o sustancias muy hidrófobas, p. ej., haciendo pasar la mezcla a través de una precolumna.

[0098] Por ejemplo, en el contexto de la purificación por lotes, el material de HIC se prepara en o se equilibra para el tampón de equilibrado deseado. Se obtiene una suspensión acuosa del material de HIC. La solución de anticuerpos se pone en contacto con la suspensión acuosa para adsorber en el material de HIC el anticuerpo que se va a separar. La solución que comprende las HCP que no se unen al material de HIC se separa de la suspensión acuosa, p. ej., permitiendo que la suspensión acuosa se asiente y retirando el sobrenadante. La suspensión acuosa se puede someter a una o más etapas de lavado. Si se desea, la suspensión acuosa se puede poner en contacto con una solución de menor conductividad para desorber anticuerpos que se han unido al material de HIC. Para eluir anticuerpos unidos, se puede reducir la concentración de sal.

[0099] Mientras que la cromatografía de intercambio iónico se basa en las cargas de los anticuerpos para aislarlos, la cromatografía de interacción hidrófoba utiliza las propiedades hidrófobas de los anticuerpos. Grupos hidrófobos del anticuerpo interactúan con grupos hidrófobos de la columna. Cuanto más hidrófoba sea una proteína, más fuerte será la interacción con la columna. De este modo, en la etapa HIC se eliminan impurezas derivadas de la célula huésped (p. ej., ADN y otras especies relacionadas con el producto, con pesos moleculares altos y bajos).

[0100] Las interacciones hidrófobas alcanzan la máxima intensidad cuando hay una fuerza iónica elevada; por lo tanto, esta forma de separación se lleva a cabo convenientemente tras precipitaciones de sales o procedimientos de intercambio iónico. La adsorción del anticuerpo en una columna de HIC se ve favorecida por concentraciones de sal elevadas, pero las concentraciones reales pueden variar dentro de un amplio intervalo de valores, dependiendo de la naturaleza del anticuerpo y del ligando de HIC concreto escogido. Diversos iones se pueden disponer en una serie de solvofobia, tal como se denomina, dependiendo de si fomentan las interacciones hidrófobas (efectos de precipitación salina o *salting-out*) o interfieren en la estructura del agua (efecto caotrópico) y provocan un debilitamiento de la interacción hidrófoba. Los cationes se clasifican en orden creciente de efecto de precipitación salina: Ba⁺⁺; Ca⁺⁺; Mg⁺⁺; Li⁺; Cs⁺; Na⁺; K⁺; Rb⁺; NH₄⁺, mientras que los aniones se pueden clasificar en orden creciente de efecto caotrópico: P⁰⁻⁻⁻; S₄⁴⁻⁻; CH₃CO₃⁻; Cl⁻; Br⁻; NO₃⁻; ClO₄⁻; I⁻; SCN⁻.

[0101] En general, los sulfatos de Na, K o NH₄ fomentan eficazmente la interacción ligando-proteína en la HIC. Se pueden formular sales que influyan sobre la fuerza de la interacción, de acuerdo con la siguiente relación: (NH₄)₂SO₄ > Na₂SO₄ > NaCl > NH₄Cl > NaBr > NaSCN. En general, resultan útiles concentraciones salinas de sulfato de amonio entre 0,75 y 2 M, o de NaCl entre aproximadamente 1 y 4 M.

[0102] Las columnas de HIC comprenden normalmente una matriz base (p. ej., agarosa entrecruzada o un material copolimérico sintético) al que se acoplan ligandos hidrófobos (p. ej., grupos alquilo o arilo). Una columna de HIC adecuada comprende una resina de agarosa sustituida con grupos fenilo (p. ej., una columna de fenil-sefarosa (Phenyl Sepharose™)). Existen muchas columnas disponibles en el mercado. Los ejemplos incluyen, entre otros: una columna Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow con alto o bajo grado de sustitución (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); una columna de alto rendimiento de Phenyl Sepharose™ (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); columnas de Fractogel™ EMD Propyl o Fractogel™ EMD Phenyl (E. Merck, Alemania); soportes de Macro-Prep™ Methyl o Macro-Prep™ t-Butyl (Bio-Rad, California); columna WP HI-Propyl (C3)™ (J. T. Baker, Nueva Jersey); y columnas Toyopearl™ de éter, fenilo o butilo (TosoHaas, PA).

45

4.7 Estrategias de purificación ejemplares

[0103] En ciertas formas de realización, la recuperación primaria puede proseguir empleando una secuencia de etapas de reducción de pH, centrifugado, y filtración para eliminar células y residuos celulares (incluidas HPC) del cultivo del biorreactor de producción. Como ejemplo no exclusivo, un cultivo que comprende anticuerpos, medios y células se puede someter a una reducción/inactivación de virus mediada por pH usando un pH ácido de 3,5 durante aproximadamente 1 hora. La reducción de pH se puede facilitar usando preparaciones de ácidos conocidos, como el ácido cítrico, p. ej., ácido cítrico 3M. La exposición a un pH ácido reduce, si no elimina por completo, los contaminantes víricos sensibles al pH y precipita algunos contaminantes procedentes de medios/células. Tras esta etapa de reducción/inactivación vírica, el pH se ajusta a 4,9 o 5,0 mediante una base como el hidróxido sódico, p. ej., hidróxido sódico 3M, durante un tiempo aproximado de veinte a cuarenta minutos. Este ajuste puede producirse a 20° C aproximadamente. En ciertas formas de realización, el cultivo con pH ajustado se centrifugó después con una fuerza de aproximadamente 7000 xg a aproximadamente 11.000 xg. En ciertas formas de realización, el sobrenadante de muestra obtenido se hace pasar después a través de una serie de filtros que comprende múltiples

50

55

filtros de profundidad. En ciertas formas de realización, la serie de filtros comprende aproximadamente doce filtros de profundidad de 16 pulgadas Cuno™, modelo 30/60ZA (3M Corp.), y aproximadamente tres carcasas redondas de filtro provistas de tres cartuchos de filtro de 0,45/0,2 mm Sartopore™ 2 (Sartorius) de 30 pulgadas. El sobrenadante clarificado se recoge en un recipiente, como por ejemplo un recipiente de cultivo preesterilizado y mantenido a 5 aproximadamente 8° C. Después se ajusta esta temperatura a aproximadamente 20° C antes de la etapa o etapas de captura cromatográfica cuyos fundamentos se explican más adelante. Cabe señalar que un experto en la materia podría variar las condiciones arriba citadas y seguiría estando dentro del alcance de la presente invención.

[0104] En ciertas formas de realización, la recuperación primaria vendrá seguida de una cromatografía de afinidad con resina de proteína A. Existen varias fuentes comerciales de resina de proteína A. Una resina adecuada es MabSelect™ de GE Healthcare. Un ejemplo de una columna adecuada rellena de MabSelect™ es una columna de 1,0 cm de diámetro x 21,6 cm de longitud (volumen de lecho: ~17 mL). Este tamaño de columna se puede usar para trabajar a escala de banco. Se puede comparar con otras columnas usadas para ampliaciones de escala. Por ejemplo, se puede usar una columna de 20 cm x 21 cm cuyo volumen de lecho es de 6,6 L para la producción a 15 escala comercial. Independientemente de la columna, esta se puede rellenar con una resina adecuada como MabSelect™.

[0105] En ciertos aspectos, la columna de proteína A se puede equilibrar con un tampón adecuado antes de cargar la muestra. Un ejemplo de tampón adecuado es un tampón Tris/NaCl, pH de 6 a 8, preferentemente 7,2. Un ejemplo concreto de condiciones de equilibrado adecuadas es Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,2. Una vez equilibrada, la muestra se puede cargar en la columna. Tras cargar la columna, esta se puede lavar una o varias veces con, p. ej., el tampón de equilibrado. Antes de eluir la columna, se pueden llevar a cabo otros lavados, incluidos lavados en los que se emplean diferentes tampones. Por ejemplo, la columna se puede lavar con uno o más volúmenes de columna de ácido cítrico/citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M a un pH de 6,0. Este lavado puede 25 venir seguido, opcionalmente, de uno o más lavados con el tampón de equilibrado. A continuación, se puede eluir la columna de proteína A con un tampón de elución apropiado. Un ejemplo de tampón de elución adecuado es un tampón de ácido acético/NaCl, pH 3,5. Condiciones apropiadas son, p. ej., ácido acético 0,1M, pH 3,5. Se puede detectar el eluido mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede seguir la absorbancia en OD₂₈₀. El eluido de la columna se puede recoger comenzando con una deflexión inicial de 0,5 UA hasta una lectura de 0,5 UA en el frente posterior del pico de elución. La fracción o fracciones de interés se pueden preparar para continuar el procesamiento. Por ejemplo, la muestra recogida se puede valorar hasta alcanzar un pH de 5,0 con Tris (p. ej., 1,0 M) a un pH de 10. Opcionalmente, esta muestra valorada se puede filtrar y seguir procesando.

[0106] La capacidad de unión dinámica (DCB) de la columna MabSelect™ se puede determinar mediante una estrategia de carga de velocidad constante, o bien de dos velocidades. La carga de velocidad constante se puede evaluar a una velocidad de 300 cm/hora durante todo el periodo de carga. La estrategia de carga de dos velocidades se puede determinar cargando la columna con hasta 35 mg de proteína/mL de resina a una velocidad lineal de 300 cm/hora, y reduciendo después la velocidad lineal a la mitad para permitir un mayor tiempo de residencia para la 40 última parte de la carga.

[0107] El eluido de proteína A se puede purificar aún más mediante una columna de intercambio catiónico. En ciertas formas de realización, el tampón de equilibrado usado en la columna de intercambio catiónico es un tampón con un pH de 5,0. Un ejemplo de un tampón adecuado es acetato de sodio 210 mM, pH 5,0. Tras el equilibrado, la 45 columna se carga con una muestra preparada en la etapa anterior de recuperación primaria. La columna se carga con una resina de intercambio catiónico, tal como CM Sepharose™ Fast Flow de GE Healthcare. La columna se lava después con el tampón de equilibrado. A continuación, la columna se somete a una etapa de elución con un tampón con una fuerza iónica superior en comparación con el tampón de equilibrado o lavado. Por ejemplo, un tampón de elución adecuado puede ser acetato de sodio 790 mM, pH 5,0. Los anticuerpos se eluirán y se pueden determinar mediante un espectrofotómetro de UV ajustado a OD_{280nm}. En un ejemplo concreto, la recogida de la elución puede ir desde 3 OD_{280nm} en la pendiente ascendente hasta 8 a OD_{280nm} en la pendiente descendente. Debe entenderse que un experto en la materia podría variar las condiciones y, aun así, seguiría estando dentro del alcance de la presente invención.

[0108] En cambio, en ciertas formas de realización, el eluido de proteína A se continúa purificando mediante una columna de intercambio aniónico. Un ejemplo no exclusivo de columna adecuada para esta etapa es una columna de 60 cm de diámetro x 30 cm de longitud cuyo volumen de lecho es 85 L. La columna rellena con una resina de intercambio aniónico, tal como Q Sepharose™ Fast Flow de GE Healthcare. La columna se puede equilibrar con siete volúmenes de columna de un tampón adecuado, como por ejemplo Tris/cloruro sódico. Un ejemplo de

condiciones adecuadas es Tris 25 mM, cloruro sódico 50 mM a pH 8,0. Un experto en la materia podría variar las condiciones y, aun así, seguiría estando dentro del alcance de la presente invención. La columna se carga con la muestra recogida de la etapa de purificación de proteína A cuyos fundamentos se describen anteriormente. En otro aspecto, la columna se carga con el eluido recogido durante el intercambio catiónico. Tras cargar la columna, esta se lava con el tampón de equilibrado (p. ej., el tampón Tris/cloruro sódico). El flujo no retenido, que contiene los anticuerpos, se puede monitorizar con un espectrofotómetro UV en OD_{280nm}. Esta etapa de intercambio aniónico reduce el nivel de impurezas relacionadas con el procedimiento, por ejemplo ácidos nucleicos como el ADN, y proteínas de célula huésped. La separación se produce debido al hecho de que los anticuerpos de interés no interactúan sustancialmente con la fase sólida de la columna ni se unen a la misma, p. ej., a la Q-Sepharose™, pero muchas impurezas sí interactúan con la fase sólida de la columna y se unen a la misma. El intercambio aniónico se puede llevar a cabo a aproximadamente 12° C.

[0109] En ciertas formas de realización, el eluido del intercambio catiónico o el intercambio aniónico, dependiendo de qué etapa de intercambio iónico se lleva a cabo en primer lugar, se filtra a continuación con, p. ej., un filtro Delipid Cuno™ de 16 pulgadas. Esta filtración, en la que se usa el filtro Delipid, puede venir seguida de, p. ej., un cartucho de filtro bicapa de 0,45/0,2 µm Sartopore™ de 30 pulgadas. El tampón de elución del intercambio iónico se puede usar para expulsar el volumen residual que queda en los filtros y preparar para la ultrafiltración/diafiltración.

[0110] Para completar correctamente la etapa de ultrafiltración/diafiltración, los medios de filtración se preparan en un tampón adecuado, p. ej., fosfato sódico 20 mM, pH 7,0. Se puede añadir una sal tal como el cloruro sódico para aumentar la fuerza iónica, p. ej., cloruro sódico 100 mM. Esta etapa de ultrafiltración/diafiltración sirve para concentrar los anticuerpos anti-IL-12, anti-TNFα o anti-IL-18, eliminar el acetato sódico y ajustar el pH. Existen filtros disponibles en el mercado para efectuar esta etapa. Por ejemplo, Millipore fabrica un casete de membrana de ultrafiltro de celulosa con un peso molecular de corte (MWCO) de 30 kD. Este procedimiento de filtración se puede llevar a cabo a temperatura ambiente o a una temperatura aproximada.

[0111] En ciertas formas de realización, la muestra obtenida en la anterior etapa de filtración de captura se somete a una segunda etapa de separación por intercambio iónico. Preferentemente, esta segunda etapa de separación por intercambio iónico comprenderá una separación basada en la carga opuesta de la primera separación por intercambio iónico. Por ejemplo, si se emplea una etapa de intercambio aniónico tras la recuperación primaria, la segunda etapa de intercambio iónico puede ser una etapa de intercambio catiónico. Y a la inversa, si la etapa de recuperación primaria vino seguida de una etapa de intercambio catiónico, esa etapa debería venir seguida de una etapa de intercambio aniónico. En ciertas formas de realización, el eluido del primer intercambio iónico se puede someter directamente a la segunda etapa de intercambio iónico en la que el eluido del primer intercambio iónico se ajusta hasta alcanzar las condiciones de tamponamiento apropiadas. Más arriba se describen condiciones y materiales aniónicos y catiónicos adecuados.

[0112] En ciertas formas de realización de la presente invención, la muestra que contiene anticuerpos se continuará procesando mediante una etapa de separación por interacción hidrófoba. Un ejemplo no exclusivo de una columna adecuada para dicha etapa es una columna de 0 cm de diámetro x 15 cm de longitud cuyo volumen de lecho es 75 L, que está rellena con una resina apropiada usada para la HIC, tal como, entre otras, Phenyl HP Sepharose™ de Amersham Biosciences, Upsala, Suecia. La preparación no retenida, obtenida en la etapa anterior de cromatografía de intercambio aniónico, y que comprende los anticuerpos de interés se puede diluir con un volumen igual de sulfato de amonio 1,7 M, fosfato sódico 50 mM, pH 7,0. Esta se puede someter después a filtración con un filtro bicapa de 0,45/0,2 µm Sartopore™ 2, o su equivalente. En ciertas formas de realización, el procedimiento de cromatografía hidrófoba comprende dos o más ciclos.

[0113] En ciertas formas de realización, la columna de HIC se equilibra primero con un tampón adecuado. Un ejemplo no exclusivo de tampón adecuado es sulfato de amonio 0,85 M, fosfato sódico 50 mM, pH 7,0. Un experto en la materia puede variar el tampón de equilibrado y seguir estando dentro del alcance de la presente invención alterando las concentraciones de los agentes tamponadores y/o sustituyendo tampones equivalentes. En ciertas formas de realización, la columna se carga después con una muestra no retenida de intercambio aniónico y se lava múltiples veces, p. ej., tres veces, con un sistema tampón adecuado tal como sulfato de amonio/fosfato sódico. Un ejemplo de sistema tampón adecuado incluye sulfato de amonio 1,1 M, fosfato sódico 50 mM con un pH de 7,0. Opcionalmente, la columna se puede someter a más ciclos de lavados. Por ejemplo, un segundo ciclo de lavado puede incluir múltiples lavados de columna, p. ej., de una a siete veces, con un sistema tampón apropiado. Un ejemplo no exclusivo de sistema tampón adecuado incluye sulfato de amonio 0,85 M, fosfato sódico 50 mM; pH de 7,0. En un aspecto, la columna cargada se somete a un tercer lavado más con un sistema tampón apropiado. La columna se puede lavar múltiples veces, p. ej., de una a tres veces, con un sistema tampón tal como sulfato de

amonio 1,1 M, fosfato sódico 50 mM con un pH de 7,0. De nuevo, un experto en la materia puede variar las condiciones del tamponamiento y seguirían estando dentro del alcance de la presente invención.

[0114] La columna se eluye con un tampón de elución apropiado. Un ejemplo adecuado de dicho tampón de elución es sulfato de amonio 0,5 M, fosfato sódico 15 mM con un pH de 7,0. Los anticuerpos de interés se pueden detectar y recoger mediante un espectrofotómetro convencional desde la pendiente ascendente en 3 OD_{280nm} hasta la pendiente ascendente del pico en 3 OD_{280nm}.

[0115] En ciertos aspectos de la invención, el eluido obtenido en la etapa de cromatografía hidrófoba se somete a filtración para eliminar partículas víricas, incluidos virus intactos, si los hay. Un ejemplo no exclusivo de un filtro adecuado es el filtro Ultipor DV50™ de Pall Corporation. En esta fase de filtración se pueden usar otros filtros víricos muy conocidos por los expertos en la materia. El eluido de la HIC se hace pasar a través de un filtro prehumedecido de 0,1 μm y una batería de filtros Ultipor DV50™ de 2 x 30 pulgadas a 234 kPa (34 psig). En ciertas formas de realización, tras el procedimiento de filtración, el filtro se lava con, p. ej., el tampón de elución de la HIC con el fin de eliminar cualquier anticuerpo que quede retenido en la carcasa del filtro. El filtrado se puede almacenar en un recipiente preesterilizado a aproximadamente 12° C.

[0116] En ciertas formas de realización, el filtrado anterior se vuelve a someter a ultrafiltración/diafiltración. Esta etapa es importante si el fin preestablecido por el profesional consiste en usar el anticuerpo en, p. ej., una formulación farmacéutica. Si se emplea, este procedimiento puede facilitar la concentración del anticuerpo, eliminar las sales del tampón usadas anteriormente y sustituirlas por un tampón de formulación concreto. En ciertas formas de realización, se lleva a cabo una diafiltración continua con múltiples volúmenes, p. ej., dos volúmenes de un tampón de formulación. Un ejemplo no exclusivo de tampón de formulación adecuado es un tampón de metionina 5 mM, manitol al 2%, sacarosa al 0,5%, pH 5,9 (sin Tween). Tras completar este intercambio de diavolumen, los anticuerpos se concentran. Una vez que se ha alcanzado una concentración predeterminada de anticuerpo, un profesional puede calcular la cantidad de Tween al 10% que se debe añadir para llegar a una concentración final de Tween de aproximadamente 0,005% (v/v).

[0117] Ciertas formas de realización de la presente invención incluirán más etapas de purificación. Entre los ejemplos de procedimientos de purificación adicionales que se pueden llevar a cabo antes, durante o después del procedimiento de cromatografía de intercambio iónico se incluyen: precipitación con etanol, enfoque isoeléctrico, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina Sepharose™, otra cromatografía de intercambio aniónico y/u otra cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de enfoque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad (p. ej., con proteína G, un anticuerpo, un sustrato de ligando o antígeno específico como reactivo de captura).

[0118] En ciertas formas de realización de la presente invención, el anticuerpo anti-IL-12 es un anticuerpo de isotipo IgA₁, IgA₂, IgD, IgE, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, o IgM que comprende las secuencias de las regiones variables de cadenas pesada y ligera que se ilustran en la figura 1. En formas de realización preferidas, el anticuerpo anti-IL-12 es un anticuerpo de isotipo IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄ que comprende las secuencias de las regiones variables de cadenas pesada y ligera que se ilustran en la figura 1, más preferentemente el anticuerpo anti-IL-12 es un anticuerpo IgG₁ que comprende las secuencias de las regiones variables de cadenas pesada y ligera que se ilustran en la figura 1. En ciertas formas de realización de la presente invención, el anticuerpo anti-TNFα es un anticuerpo de isotipo IgA₁, IgA₂, IgD, IgE, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, o IgM que comprende las secuencias de las regiones variables de cadenas pesada y ligera que se ilustran en la figura 3. En formas de realización preferidas, el anticuerpo anti-TNFα es un anticuerpo de isotipo IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄ que comprende las secuencias de las regiones variables de cadenas pesada y ligera que se ilustran en la figura 3, más preferentemente el anticuerpo anti-TNFα es un anticuerpo IgG₁ que comprende las secuencias de las regiones variables de cadenas pesada y ligera que se ilustran en la figura 3.

5. Procedimientos de análisis de la pureza de la muestra

5.1 Análisis de proteína de célula huésped

[0119] A continuación se describen procedimientos para determinar los niveles residuales de concentración de proteína de célula huésped (HCP) en la composición de anticuerpo aislado/purificado.

[0120] Tal como se describe anteriormente, es conveniente excluir las HCP del producto final de la sustancia buscada, p. ej., el anticuerpo anti-IL-12, anti-TNFα o anti-IL-18. Si no se logran identificar y eliminar suficientemente

las HCP del anticuerpo buscado, se puede producir una reducción en la eficacia y/o reacciones adversas en el destinatario.

[0121] Tal como se usa en la presente memoria, la expresión «ELISA HCP» hace referencia a un ELISA en el que el segundo anticuerpo utilizado en el análisis es específico para las HCP producidas a partir de células, p. ej., células CHO, usadas para generar el anticuerpo (p. ej., el anticuerpo anti-IL-12, anti-TNF α o anti-IL-18). El segundo anticuerpo se puede producir de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el segundo anticuerpo se puede producir con las HCP obtenidas en tandas de producción de sueros de control y en tandas de purificación, es decir, se usa la misma línea celular usada para producir el anticuerpo de interés, pero la línea celular no se transfecta con ADN del anticuerpo. En una forma de realización ejemplar, el segundo anticuerpo se produce con HCP similares a las expresadas en el sistema de expresión celular que se elija, es decir, el sistema de expresión celular usado para producir el anticuerpo buscado.

[0122] Por lo general, el ELISA de HCP comprende el intercalado de un líquido de muestra que comprende HCP entre dos capas de anticuerpos, es decir, un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo. La muestra se incuba, y durante ese tiempo se capturan las HCP de la muestra mediante el primer anticuerpo, por ejemplo, pero no exclusivamente, anti-CHO caprino purificado por afinidad (Cygnus). Se añade un segundo anticuerpo, o mezcla de anticuerpos, etiquetados y específicos para las HCP producidas a partir de las células usadas para generar el anticuerpo, p. ej., HCP de anti-CHO biotinilado, y se une a las HCP contenidas en la muestra. En ciertas formas de realización, los anticuerpos primero y segundo son anticuerpos policlonales. En ciertos aspectos, los anticuerpos primero y segundo son mezclas de anticuerpos policlonales cultivados con HCP, como por ejemplo, pero no exclusivamente, mezcla de anticuerpo caprino biotinilado anti proteína de célula huésped 599/626/748. La cantidad de HCP contenida en la muestra se determina llevando a cabo la prueba apropiada en función de la etiqueta del segundo anticuerpo.

[0123] Se puede usar un ELISA de HCP para determinar el nivel de HCP en una composición de anticuerpos, como por ejemplo un eluido o fracción no retenida obtenidos mediante el procedimiento descrito anteriormente. La presente invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo, en la que dicha composición no presenta un nivel detectable de HCP, según se determinó mediante un análisis inmunoenzimático de HCP («ELISA»).

5.2 Análisis de material de la cromatografía de afinidad

[0124] A continuación se describen procedimientos para determinar los niveles residuales de material de la cromatografía de afinidad en la composición de anticuerpo aislado/purificado.

[0125] En ciertos contextos, dicho material se filtra en la composición de anticuerpo durante el procedimiento de purificación. En ciertas formas de realización, se lleva a cabo un análisis para identificar la concentración de proteína A en la composición de anticuerpo aislado/purificado. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión «ELISA de proteína A» hace referencia a un ELISA en el que el segundo anticuerpo usado en el análisis es específico para la proteína A empleada para purificar el anticuerpo de interés, p. ej., anticuerpo anti-IL-12, anti-TNF α o anti-IL-18. El segundo anticuerpo se puede producir de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el segundo anticuerpo se puede producir con proteína A natural o recombinante en el contexto de los procedimientos convencionales para la generación y producción de anticuerpos.

[0126] Por lo general, el ELISA de proteína A comprende el intercalado de una muestra de líquido que comprende proteína A entre dos capas de anticuerpos anti-proteína A, es decir, un primer anticuerpo anti-proteína A y un segundo anticuerpo anti-proteína A. La muestra se expone a una primera capa de anticuerpo anti-proteína A, por ejemplo, pero no exclusivamente, anticuerpos policlonales o mezclas de anticuerpos policlonales, y se incuba durante el tiempo suficiente para que la proteína A de muestra sea capturada por el primer anticuerpo. Después se añade un segundo anticuerpo etiquetado, por ejemplo, pero no exclusivamente, anticuerpos policlonales o mezclas de anticuerpos policlonales, específicos para la proteína A, y se une a la proteína A capturada contenida en la muestra. Otros ejemplos de anticuerpos anti-proteína A que resultan útiles en el contexto de la presente invención incluyen, entre otros, anticuerpos anti-proteína A de pollo y anti-proteína A biotinilados. La cantidad de proteína A contenida en la muestra se determina llevando a cabo la prueba apropiada en función de la etiqueta del segundo anticuerpo. Se pueden emplear análisis similares para identificar la concentración de otros materiales de cromatografía de afinidad.

[0127] Se puede usar un ELISA de proteína A para determinar el nivel de proteína A en una composición de

anticuerpos, como por ejemplo un eluido o fracción no retenida obtenidos mediante el procedimiento descrito anteriormente. La presente invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo, en la que dicha composición no presenta un nivel detectable de proteína A, según se determinó mediante un análisis de inmunoenzimático de proteína A («ELISA»).

5

6. Otras modificaciones

[0128] Los anticuerpos de la presente invención se pueden modificar. En algunas formas de realización, los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno se modifican químicamente para proporcionar el efecto deseado.

10 Por ejemplo, se puede llevar a cabo la pegilación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención mediante cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica, tal como se describe, p. ej., en las siguientes referencias: *Focus on Growth Factors* 3: 4-10 (1992); el documento EP 0154 316; y el documento EP 0 401 384.

15 **[0129]** En un aspecto, la pegilación se lleva a cabo a través de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula reactiva de polietilenglicol (o un polímero reactivo análogo soluble en agua). Un polímero soluble en agua que resulta adecuado para la pegilación de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención es el polietilenglicol (PEG). Tal como se usa en la presente memoria, el término «polietilenglicol» abarca cualquiera de las formas de PEG que se han usado para modificar otras proteínas, tales como mono (CI-CIO) alcoxi-
20 o ariloxi-polietilenglicol.

[0130] Los procedimientos para preparar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención pegilados comprenderá por lo general las etapas de (a) reacción del anticuerpo o fragmento de anticuerpo con polietilenglicol, como por ejemplo un éster o aldehído reactivo derivado del PEG, en condiciones adecuadas en las que el
25 anticuerpo o fragmento de anticuerpo se fija a uno o más grupos PEG, y (b) obtención de los productos de reacción. Para un experto en la materia, resultará evidente la selección de las condiciones de reacción óptimas o las reacciones de acilación en función de parámetros conocidos y del resultado deseado.

[0131] En general, se pueden usar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos para la IL-12, TNF α o IL-18 para tratar trastornos de la invención relacionados con la IL-12, relacionados con TNF α o relacionados con la IL-18 mediante la administración de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos anti-IL-12, anti-TNF α o anti-IL-18 descritos en la presente memoria. Por lo general, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pegilados poseen una
30 semivida más larga, en comparación con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos no pegilados. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pegilados se pueden emplear solos, juntos o combinados con otras composiciones farmacéuticas.
35

[0132] Una anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se puede modificar o enlazar a otra molécula funcional (p. ej., otro péptido o proteína). Por consiguiente, se entiende que los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención incluirán formas derivadas o modificadas de cualquier otro modo de los anticuerpos
40 humanos anti-hIL-12, anti-TNF α o anti-hIL-18 descritos en la presente memoria, incluidas moléculas de inmunoadhesión. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención puede estar funcionalmente ligado (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de cualquier otro modo) a una o más entidades moleculares, como por ejemplo otro anticuerpo (p. ej., un anticuerpo biespecífico o diacuerpo), un agente detectable, una agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que pueda mediar la
45 asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (como por ejemplo una región nuclear de estreptavidina o un marcador de polihistidina).

[0133] Un tipo de anticuerpo derivado se produce entrecruzando dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de distintos tipos, p. ej., para crear anticuerpos biespecíficos). Entre los entrecruzadores adecuados se incluyen
50 aquellos que son heterobifuncionales, provistos de dos grupos distintivamente reactivos separados por un espaciador apropiado (p. ej., éster de maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) o homobifuncionales (p. ej., suberato de disuccinimidilo). Dichos conectores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

[0134] Entre los agentes detectables útiles con los que se puede modificar el anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se incluyen compuestos fluorescentes. Entre los ejemplos de agentes detectables fluorescentes se incluyen: fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también se puede modificar con enzimas detectables, como por ejemplo: fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa y similares. Cuando se modifica un anticuerpo con una
55 enzima detectable, se detecta añadiendo más reactivos utilizados por la enzima para producir un producto de

reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable peroxidasa de rábano, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina da lugar a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también se puede modificar con biotina, y se puede detectar mediante una medición indirecta de la unión con la avidina o estreptavidina.

5

7. Composiciones farmacéuticas

[0135] Se desvela que los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas para su administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en la presente memoria, «excipiente farmacéuticamente aceptable» incluye todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Entre los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables, se incluyen uno o más de los siguientes: agua, solución salina, solución salina con tampón fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como sus combinaciones. En muchos casos, resulta conveniente incluir en la composición agentes isotónicos, p. ej., azúcares; polialcoholes como manitol, sorbitol; o cloruro sódico. Los excipientes farmacéuticamente aceptables también pueden comprender pequeñas cantidades de sustancias auxiliares, como p. ej., agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que aumentan el periodo de validez o la eficacia del anticuerpo o porción de anticuerpo. Se desvela que los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral. El anticuerpo o las porciones de anticuerpo se pueden preparar en forma de una solución inyectable que contiene, p. ej., 0,1-250 mg/mL de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta por una forma farmacéutica líquida o liofilizada en una jeringuilla precargada, ampolla o vial de vidrio tipo *flint* o ámbar. El tampón puede ser L-histidina aproximadamente 1 a 50 mM, (óptimamente, 5 a 10 mM), a un pH de 5,0 a 7,0 (óptimamente, pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen, no exclusivamente: succinato sódico, citrato sódico, fosfato sódico o fosfato potásico. También se puede usar cloruro sódico para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0 a 300 mM (óptimamente, 150 mM para una forma farmacéutica líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma farmacéutica liofilizada, principalmente de 0 a 10% de sacarosa (óptimamente, de 0,5 a 1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes de carga para una forma farmacéutica liofilizada, principalmente de 1 a 10% de manitol (óptimamente, 24%). Se pueden usar estabilizantes tanto en la forma farmacéutica líquida como en la liofilizada, principalmente L-metionina 1 a 50 mM (óptimamente, 5 a 10 mM). Otros agentes de carga adecuados incluyen glicina, arginina, se pueden incluir como 0 a 0,05% de polisorbato-80 (óptimamente, 0,005 a 0,01%). Otros agentes tensioactivos incluyen, no exclusivamente, polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ.

35

[0136] Se desvela que la composición farmacéutica incluye el anticuerpo en una dosis de 0,101 mg/kg a 10 mg/kg. En otro aspecto, las dosis del anticuerpo incluyen aproximadamente 1 mg/kg administrado en semanas alternas, o aproximadamente 0,3 mg/kg administrados semanalmente. Un profesional experto puede calcular la dosis y el régimen correctos de administración. Se desvela que las composiciones desveladas en la presente memoria pueden presentarse en diversas formas. Entre estas se incluyen, p. ej.: formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (p. ej., soluciones inyectables y para infusión), dispersiones o suspensiones, comprimidos, pastillas, polvos, liposomas y supositorios. La forma depende de, p. ej., la vía de administración y la aplicación terapéutica escogidas. Las composiciones típicas se presentan en forma de soluciones inyectables o para infusión, como por ejemplo composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de humanos con otros anticuerpos. Una vía de administración es la parenteral (p. ej., intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En un aspecto, el anticuerpo se administra mediante inyección o infusión intravenosa. En otro aspecto, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea. Se desvela que las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del principio activo (es decir, el anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguida de una esterilización por filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos liofilizados y estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación son el secado al vacío y el secado por pulverización que produce un polvo del ingrediente activo, además de cualquier otro ingrediente que se desee de una solución del mismo previamente esterilizado por filtración. Se puede mantener la fluidez correcta de una solución, p. ej., mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula

50

55

requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Se puede lograr una absorción prolongada de composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, p. ej., sales monoestearato y gelatina.

5 **[0137]** Se desvela que los anticuerpos o porciones de anticuerpos de la presente invención se pueden administrar mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, una vía/modo de administración es la inyección subcutánea, la inyección intravenosa o la infusión. Como observará el experto en la materia, la vía/modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas formas de realización, el principio activo se puede preparar con un excipiente que protegerá al compuesto frente a su rápida liberación, como por ejemplo
10 una formulación de liberación controlada, incluidos implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles y biodegradables, como por ejemplo: etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la materia. Véase, p. ej., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker,
15 Inc., Nueva York, 1978.

[0138] Un anticuerpo o porción de anticuerpo desvelado en la presente memoria se puede administrar por vía oral, p. ej., con un diluyente inerte o un excipiente comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también se puede introducir en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimir para formar
20 comprimidos o incorporar directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos se pueden incorporar con excipientes y usarlos en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención mediante otra vía distinta a la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto o coadministrar el compuesto con un material que evite su inactivación.

25 **[0139]** También se pueden incorporar principios activos suplementarios en las composiciones. En ciertos aspectos, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se coformula y/o coadministra con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar trastornos en los que la actividad de la IL-12, TNF α o IL-18 resulta perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo anti-IL-12, anti-TNF α o anti-IL-18 de la invención se
30 puede coformular y/o coadministrar con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (p. ej., anticuerpos que se unen a otras citocinas o que se unen a moléculas de la superficie celular). Además, se pueden usar uno o más anticuerpos de la invención en combinación con dos o más de los anteriores agentes terapéuticos. En dichas terapias combinadas se pueden usar ventajosamente dosis menores de los agentes terapéuticos administrados, con lo que se evitan posibles toxicidades o complicaciones relacionadas con las diversas
35 monoterapias. El profesional experto observará que cuando los anticuerpos de la invención se usan como parte de una terapia combinada, puede ser conveniente emplear una dosis menor de anticuerpo que cuando se administra el anticuerpo por sí solo a un sujeto (p. ej., se puede lograr un efecto terapéutico sinérgico a través del uso de una terapia combinada que, a su vez, permite emplear una dosis menor del anticuerpo para lograr el efecto terapéutico deseado).

40 **[0140]** Debe entenderse que los anticuerpos de la invención o su parte de unión al antígeno se pueden usar por sí solos o en combinación con un agente adicional, p. ej., un agente terapéutico, siendo dicho agente adicional seleccionado por el experto para su fin previsto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica por resultar útil para tratar la enfermedad o afección que se esté tratando mediante el
45 anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que confiere una propiedad benéfica a la composición terapéutica, p. ej., un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

[0141] Se desvela que las combinaciones descritas en la presente memoria son las combinaciones que resultan útiles para sus fines previstos. Los agentes que se exponen más adelante tienen un fin ilustrativo y no se deben
50 entender como una limitación. Las combinaciones que forman parte de la presente invención pueden ser anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado entre la lista que aparece a continuación. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, p. ej., dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede llevar a cabo su función prevista.

55 **[0142]** Algunas combinaciones son un fármaco o fármacos antiinflamatorios no esteroideos, también denominados AINE, que incluyen fármacos como el ibuprofeno. Otras combinaciones consisten en corticosteroides, incluida la prednisolona; los efectos secundarios sobradamente conocidos del uso de esteroides se pueden reducir o incluso eliminar, disminuyendo gradualmente la dosis de esteroides requerida cuando se trata a los pacientes en combinación con los anticuerpos de la presente invención. Entre los ejemplos no exclusivos de agentes terapéuticos

para la artritis reumatoide con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención, se incluyen los siguientes: fármaco o fármacos antiinflamatorios supresores de citocina (CSAID); anticuerpos p antagonistas de otras citocinas humanas u hormonas de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención o sus porciones de unión al antígeno se pueden combinar con anticuerpos para moléculas de la superficie celular como: CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, o sus ligandos, incluido CD 154 (gp39 o CD40L).

[0143] Algunas combinaciones de agentes terapéuticos pueden interferir en diferentes puntos del proceso autoinmunitario y la posterior cascada inflamatoria; entre los ejemplos se incluyen antagonistas de TNF tales como: anticuerpos híbridos, humanizados o humanos contra el TNF, D2E7, (solicitud de patente de EE. UU. n. ° 08/599.226 presentada el 9 de febrero de 1996), cA2 (Remicade™), CDP 571, fragmentos de anticuerpos anti-TNF (p. ej., CDP870), y receptores solubles del TNF p55 o p75, sus derivados, p75TNFR1gG (Enbrel™) o p55TNFR1gG (Lenercept), receptor soluble de la IL-13 (sIL-13), y también inhibidores de la enzima convertidora del TNF α (TACE); asimismo, los inhibidores de la IL-1 (p. ej., inhibidores de la enzima convertidora de la Interleucina-1, tales como Vx740, o IL-1RA, etc.) pueden resultar eficaces por la misma razón. Otras combinaciones incluyen interleucina 11, anti-P7s y ligando glucoproteico de la p-selectina (PSGL). Otras combinaciones emplean otros elementos clave de la respuesta inmunitaria que pueden actuar de forma paralela, dependiente o concertada respecto a la función de la IL-12; se incluyen especialmente antagonistas de la IL-18, incluidos anticuerpos contra la IL-18 o receptores solubles de la IL-18, o proteínas de unión a la IL-18. Se ha demostrado que las funciones de la IL-12 y la IL-18 se solapan pero son distintas y lo más eficaz podría ser una combinación de antagonistas de ambas. Otra combinación incluye inhibidores anti-CD4 de no-agotamiento. Otras combinaciones incluyen antagonistas de la vía coestimuladora CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2), incluidos anticuerpos, receptores solubles o ligandos antagonistas.

[0144] Los anticuerpos de la invención, o sus porciones de unión al antígeno, se pueden combinar con agentes tales como: metotrexato, 6-MP, azatioprina, sulfasalazina, mesalazina, olsalazina, cloroquina/hidroxicloroquina, penicilamina, aurotiomalato (intramuscular y oral), azatioprina, colchicina, corticosteroides (oral, inhalados e inyección local), agonistas de los receptores adrenérgicos β -2 (salbutamol, terbutalina, salmeterol), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromilo, ketotifeno ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, AINE, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de la fosfodiesterasa, agonistas de la adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización llevada a cabo por citocinas proinflamatorias tales como TNF α o IL-1 (p. ej., inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP cinasa), inhibidores de la enzima convertidora de la IL-1 β (p. ej., Vx740), anti-P7s, ligando glucoproteico de la p-selectina (PSGL), inhibidores de la enzima convertidora de TNF α (TACE), inhibidores de la señalización de células T como, por ejemplo, inhibidores de la cinasa, inhibidores de la metaloproteínasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, receptores solubles de citocinas y sus derivados (p. ej., receptores solubles de TNF p55 o p75 y los derivados p75TNFR1gG (Enbrel.TM.) y p55TNFR1gG (Lenercept), sIL-1 RI, sIL-1 RII, sIL-6R, receptor soluble de la IL-13 (sIL-13)) y citocinas antiinflamatorias (p. ej., IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β). Algunas combinaciones incluyen metotrexato o leflunomida y, en casos moderados o graves de artritis reumatoide, ciclosporina.

[0145] Entre los ejemplos no exclusivos de agentes terapéuticos para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención, se incluyen los siguientes: budenósida, hormona de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurine, azatioprina, metronidazol, inhibidores de la lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores del tromboxano, antagonistas del receptor IL-1, anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α , anti-IL-6, hormonas del crecimiento, inhibidores de la elastasa, compuestos de piridinil-imidazol, anticuerpos contra o antagonistas de otras citocinas u hormonas de crecimiento humanas, p. ej.: TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o sus porciones de unión al antígeno, se pueden combinar con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como: CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o sus porciones de unión al antígeno, también se pueden combinar con agentes como: metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, AINE, p. ej., ibuprofeno, corticosteroides como la prednisolona, inhibidores de la fosfodiesterasa, agonistas de la adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización llevada a cabo por citocinas proinflamatorias como TNF α o IL-1 (p. ej., inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP cinasa), inhibidores de la enzima convertidora de la IL-1 β (p. ej., Vx740), anti-P7s, ligando glucoproteico de la p-selectina (PSGL), inhibidores de la enzima convertidora de TNF α , inhibidores de la señalización de células T como, por ejemplo, inhibidores de la cinasa,

inhibidores de la metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, receptores solubles de citocinas y sus derivados (p. ej., receptores solubles de TNF p55 o p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, receptor soluble de la IL-13 (sIL-13)) y citocinas antiinflamatorias (p. ej., IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ).

5

[0146] Entre los ejemplos de agentes terapéuticos para la enfermedad de Crohn en los que se puede combinar un anticuerpo o porción de unión al antígeno, se incluyen los siguientes: antagonistas del TNF, p. ej., anticuerpos anti-TNF, D2E7 (solicitud de patente de EE. UU. n.º 08/599.226, presentada el 9 de febrero de 1996), cA2 (Remicade™), CDP 571, fragmentos de anticuerpos anti-TNF (p. ej., CDP870), y constructos TNFR-Ig (p75TNFR1gG (Enbrel™) y p55TNFR1gG (Lenercept)), anti-P7s, ligando glucoproteico de la p-selectina (PSGL), receptor soluble de la IL-13 (sIL-13), e inhibidores de la PDE4. Los anticuerpos de la invención, o sus porciones de unión al antígeno se pueden combinar con corticosteroides, p. ej., budenósida y dexametasona. Los anticuerpos de la invención, o sus porciones de unión al antígeno, también se pueden combinar con agentes como: sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico y olsalazina, y agentes que interfieren con la síntesis o acción de citocinas proinflamatorias como la IL-1, p. ej., inhibidores de la enzima convertidora de la IL-1 (p. ej., Vx740) y el IL-1ra. Los anticuerpos de la invención, o sus porciones de unión al antígeno, también se pueden usar con inhibidores de la señalización de células T, p. ej., 6-mercaptopurinas inhibidoras de tirosina cinasa. Los anticuerpos de la invención, o sus porciones de unión al antígeno, se pueden combinar con IL-11.

[0147] Entre los ejemplos no exclusivos de agentes terapéuticos para tratar la esclerosis múltiple con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención, se incluyen los siguientes: corticosteroides, prednisolona, metilprednisolona, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, 4-aminopiridina, tizanidina, IFNβ1a (Avonex; Biogen), IFNβ1a (Betaseron; Chiron/Berlex), Copolímero 1 (Cop-1, Copaxone, Teva Pharmaceutical Industries, Inc.), oxígeno hiperbárico, inmunoglobulina intravenosa, cladribina, anticuerpos contra o antagonistas de otras citocinas u hormonas del crecimiento humanas, p. ej.: TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o sus porciones de unión al antígeno, se pueden combinar con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como: CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o sus porciones de unión al antígeno, también se pueden combinar con agentes como: metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, AINE, p. ej., ibuprofeno, corticosteroides como la prednisolona, inhibidores de la fosfodiesterasa, agonistas de la adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización llevada a cabo por citocinas proinflamatorias como TNFα o IL-1 (p. ej., inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP cinasa), inhibidores de la enzima convertidora de la IL-1β (p. ej., Vx740), anti-P7s, ligando glucoproteico de la p-selectina (PSGL), inhibidores de la TACE, inhibidores de la señalización de células T como, por ejemplo, inhibidores de la cinasa, inhibidores de la metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, receptores solubles de citocinas y sus derivados (p. ej., receptores solubles de TNF p55 o p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, receptor soluble de la IL-13 (sIL-13)) y citocinas antiinflamatorias (p. ej., IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ).

40

[0148] Entre los ejemplos de agentes terapéuticos contra la esclerosis múltiple con los que se puede combinar el anticuerpo o porción del mismo de unión al antígeno, se incluyen: IFNβ, p. ej., IFNβ1a e IFNβ1a, copaxona, corticosteroides, inhibidores de la IL-1, inhibidores de la TNFα, y anticuerpos contra el ligando CD40 y CD80.

[0149] Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden incluir una «cantidad terapéuticamente eficaz» o una «cantidad profilácticamente eficaz» de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. La expresión «cantidad terapéuticamente eficaz» hace referencia a una cantidad eficaz, a las dosis y en los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o porción de anticuerpo puede variar en función de factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que los efectos beneficiosos del anticuerpo o porción del anticuerpo compensan sobradamente cualquier efecto tóxico o perjudicial. La expresión «cantidad profilácticamente eficaz» hace referencia a una cantidad eficaz, en las dosis y periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, debido a que en los sujetos se usa una dosis profiláctica antes de la enfermedad o en una etapa temprana, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

50

[0150] La posología se puede ajustar para proporcionar la respuesta deseada (p. ej., una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo intravenoso, se pueden administrar varias dosis

divididas a lo largo de un periodo de tiempo o se puede reducir o aumentar la dosis proporcionalmente, según lo exija la situación terapéutica. En ciertas formas de realización, resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosis unitarias para mayor facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosis unitaria, tal como se usa en la presente memoria, hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para mamíferos sometidos a tratamiento; cada unidad comprende una cantidad determinada del principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el excipiente farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosis unitaria de la invención viene determinada por y depende directamente de (a) las características específicas del principio activo y el efecto terapéutico o profiláctico concreto que se desea lograr, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de la composición de dicho principio activo para el tratamiento de la sensibilidad en los pacientes.

[0151] Un intervalo ejemplar, no exclusivo, para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es 0,01 a 20 mg/kg, o 1 a 10 mg/kg, o 0,3 a 1 mg/kg. Cabe observar que los valores de las dosis pueden variar con el tipo y la gravedad del trastorno que se quiere aliviar. También debe entenderse que para cualquier sujeto concreto, se debe ajustar la posología a lo largo del tiempo, en función de las necesidades individuales y del juicio de la persona encargada de administrar o supervisar la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosis que se exponen en la presente memoria tienen únicamente un fin ejemplar y se deben interpretar como una limitación del alcance o la práctica de la composición reivindicada.

20 8. Usos de los anticuerpos de la invención

8.1 Usos generales del anticuerpo anti-IL-12

[0152] Dada su capacidad para unirse a la IL-12, los anticuerpos anti-IL-12, o porciones de los mismos, de la invención se pueden usar para detectar la IL-12, en un aspecto, la hIL-12 (p. ej., en una matriz de muestra, en un aspecto, una muestra biológica, como por ejemplo suero o plasma), mediante un inmunoanálisis convencional, tal como un análisis inmunoenzimático (ELISA), un radioinmunoanálisis (RIA) o inmunohistoquímica. La invención proporciona un procedimiento para detectar la IL-12 en una muestra biológica que comprende la puesta en contacto de una muestra con un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención y la detección del anticuerpo (o porción de anticuerpo) unido a la IL-12 o el anticuerpo (o porción de anticuerpo) no unido, para detectar de ese modo la IL-12 contenida en la muestra. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Entre las sustancias detectables adecuadas se incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Entre los ejemplos de enzimas adecuadas, se incluyen: peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, acetilcolinesterasa; entre los ejemplos de complejos de grupos prostéticos, se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; entre los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados, se incluyen: umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H . La detección de la IL-12 en una muestra puede resultar útil en un contexto diagnóstico, por ejemplo en el diagnóstico de un trastorno relacionado con un aumento en la IL-12 y/o puede resultar útil para identificar a un sujeto que esté bajo tratamiento con un anticuerpo anti-IL-12.

[0153] Como alternativa al marcado del anticuerpo, se puede analizar la IL-12 de una muestra mediante un inmunoanálisis competitivo en el que se utilizan, p. ej., soluciones estándar de rhIL-12 marcado con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-12 no marcado, como por ejemplo un anticuerpo anti-hIL-12. En este análisis, la muestra, las soluciones estándar de rhIL-12 marcado y el anticuerpo anti-hIL-12 se combinan y se determina la cantidad de estándar rhIL-12 marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de hIL-12 contenida en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de solución estándar de rhIL-12 marcado unido al anticuerpo anti-IL-12.

[0154] Se desvela que los anticuerpos y porciones de anticuerpos desvelados en la presente memoria son capaces de neutralizar la actividad in vivo e in vitro de la IL-12, en un aspecto, una actividad de la hIL-12. Por consiguiente, los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención se pueden usar para inhibir la actividad de la IL-12, p. ej., en un cultivo celular que contiene IL-12, en sujetos humanos u otros mamíferos con IL-12 con la que un anticuerpo de la invención presenta actividad cruzada (p. ej., primates como el babuino, cynomolgus y rhesus). En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humano aislado, o porción del mismo de unión a antígeno, que neutraliza la actividad de la IL-12 humana, y al menos otra IL-12 de primate seleccionada entre el grupo formado por: IL-12 de babuino, IL-12 de tití, IL-12 de chimpancé, IL-12 de cynomolgus e IL-12 de rhesus, pero que no neutraliza la actividad de la IL-12 de ratón. En un aspecto, la IL-12 es IL-12 humana. Por ejemplo, en un cultivo

celular que contiene, o del que se sospecha que contiene hIL-12, se puede añadir un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención al medio de cultivo para inhibir la actividad de la hIL-12 en el cultivo.

[0155] En el presente documento se desvela un procedimiento para inhibir la actividad de la IL-12 en un sujeto 5 aquejado de un trastorno en el que la actividad de la IL-12 resulta perjudicial. Se ha determinado que la IL-12 desempeña un papel en la fisiopatología de una gran variedad de trastornos (Windhagen y col. (1995) *J. Exp. Med.* 182: 1985-1996; Morita y col. (1998) *Arthritis and Rheumatism*. 41: 306-314; Bucht y col., (1996) *Clin. Exp. Immunol.* 103: 347-367; Fais y col. (1994) *J. Interferon Res.* 14:235-238; Pyrronchi y col., (1997) *Am. J. Path.* 150:823-832; Monteleone y col., (1997) *Gastroenterology*. 112:1169-1178, y Berrebi y col., (1998) *Am. J. Path.* 152:667-672; 10 Pyrronchi y col. (1997) *Am. J. Path.* 150:823-832). La invención proporciona procedimientos, desvelados en el presente documento, para inhibir la actividad de la IL-12 en un sujeto aquejado de dicho trastorno, y dicho procedimiento comprende la administración de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención al sujeto, de manera que se inhiba la actividad de la IL-12 en el sujeto. En un aspecto la IL-12 es IL-12 humana y el sujeto es un sujeto humano. Otra posibilidad consiste en que el sujeto sea un mamífero que exprese la IL-12 con la que el 15 anticuerpo de la invención presenta reacción cruzada. Además, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido hIL-12 (p. ej., mediante la administración de hIL-12 o mediante la expresión de un transgén hIL-12). Se puede administrar un anticuerpo de la invención a un sujeto humano por motivos terapéuticos. Además, un se puede administrar un anticuerpo de la invención a un mamífero no humano que expresa una IL-12 con la que el anticuerpo presenta una reacción cruzada, con fines veterinarios o como modelo animal de enfermedad humana. A propósito 20 de este último, dichos modelos animales pueden resultar útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (p. ej., analizar la posología y los tiempos de administración).

[0156] Tal como se usa en la presente memoria, se entenderá que la frase «un trastorno en el que la actividad de la IL-12 resulta perjudicial» incluye enfermedades u otros trastornos en los que se ha demostrado que la presencia 25 de IL-12 en un sujeto aquejado del trastorno es, o se sospecha que es la responsable de la fisiopatología del trastorno, o bien un factor que contribuye al empeoramiento del trastorno. Por consiguiente, un trastorno en el que la actividad de la IL-12 resulta perjudicial es un trastorno en el que se espera que la inhibición de la actividad de la IL-12 alivie los síntomas y/o el avance del trastorno. Dichos trastornos se pueden manifestar, p. ej., por un aumento en la concentración de IL-12 en un fluido biológico de un sujeto aquejado del trastorno (p. ej., un aumento en la 30 concentración de IL-12 en el suero, plasma, fluido sinovial, etc. del sujeto), que se puede detectar, p. ej., mediante un anticuerpo anti-IL-12, tal como se describe anteriormente. Existen numerosos ejemplos de trastornos en los que la actividad de la IL-12 resulta perjudicial. En un aspecto, los anticuerpos o sus porciones de unión al antígeno, se pueden usar en una terapia para tratar las enfermedades o trastornos descritos en la presente memoria. En otro aspecto, los anticuerpos o sus porciones de unión al antígeno, se pueden usar para la fabricación de un medicamento para tratar las enfermedades o trastornos descritos en la presente memoria. El uso de los anticuerpos 35 y porciones de anticuerpos de la invención en el tratamiento de unos pocos trastornos específicos en exclusivos se explica más adelante.

[0157] La interleucina 12 desempeña un papel clave en la patología relacionada con diversas enfermedades en las 40 que entran en juego elementos inmunitarios e inflamatorios. Estas enfermedades incluyen, entre otras: artritis reumatoide, artrosis, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, artritis psoriásica, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatoesclerosis, dermatitis atópica, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante de órgano, enfermedad inmunitaria aguda o 45 crónica relacionada con el trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Graves-Basedow, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Schoenlein-Henoch, vasculitis microscópica en los riñones, hepatitis crónica activa, uveítis, choque séptico, síndrome del choque tóxico, síndrome séptico, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea 50 de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ictus, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, tumores malignos, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Addison, insuficiencia pluriglandular de tipo I e insuficiencia pluriglandular de tipo II esporádicas, síndrome de Schmidt, síndrome disneico (agudo) del adulto, alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriásica, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropática, artropatía relacionada con clamidia, yersinia y salmonela, 55 espondiloartropatía, enfermedad aterosclerosa/arterioesclerosis, alergia atópica, enfermedad ampollosa autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, enfermedad penfigoide por IgA lineal, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia hemolítica Coombs positiva, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad de Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis criptógena autoinmunitaria, síndrome de inmunodeficiencia adquirida,

enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, Hepatitis C, inmunodeficiencia variable común (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, esterilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, fibrosis pulmonar, alveolitis fibrosante criptógena, enfermedad pulmonar intersticial posinflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial relacionada con enfermedad del tejido
 5 conjuntivo, enfermedad pulmonar intersticial relacionada con enfermedad mixta del tejido conjuntivo, enfermedad pulmonar intersticial relacionada con esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial relacionada con artritis reumatoide, enfermedad pulmonar intersticial relacionada con lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar relacionada con dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar relacionada con enfermedad de Sjögren, enfermedad pulmonar relacionada con espondiloartritis anquilosante, enfermedad pulmonar vasculítica difusa,
 10 enfermedad pulmonar relacionada con hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial medicamentosa, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinófila crónica, enfermedad pulmonar infiltrante linfocitaria, enfermedad pulmonar intersticial posinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria de tipo-1 (hepatitis autoinmunitaria o lúpica clásica), hepatitis autoinmunitaria de tipo-2 (hepatitis relacionada con anticuerpos anti-LKM), hipoglucemia mediada por mecanismos autoinmunitarios, insulinoresistencia de tipo B con
 15 acantosis pigmentaria, hipoparatiroidismo, enfermedad inmunitaria aguda relacionada con el trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria crónica relacionada con el trasplante de órganos, artrosis, colangitis esclerosante primaria, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmunitaria, enfermedad renal no específica, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, esterilidad masculina idiopática o no específica, autoinmunidad espermática, esclerosis múltiple (todos los subtipos), diabetes mellitus
 20 insulino dependiente, oftalmía simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad del tejido conjuntivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nudosa, fiebre reumática aguda, espondiloartritis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, enfermedad/artritis de Takayasu, trombocitopenia autoinmunitaria, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hipertiroidismo, hipotiroidismo bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmunitario atrófico, mixedema primario, uveítis facógena,
 25 vasculitis primaria y vitiligo. Los anticuerpos humanos, y porciones de anticuerpos, de la presente invención se pueden usar para tratar enfermedades autoinmunitarias, en particular las relacionadas con una inflamación, incluidas: espondiloartritis reumatoide, alergia, diabetes autoinmunitaria, y uveítis autoinmunitaria.

[0158] En ciertos aspectos, los anticuerpos de la invención o sus porciones de unión al antígeno, se usan para
 30 tratar artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, diabetes mellitus insulino dependiente y psoriasis.

8.2 Uso de anticuerpo anti-IL-12 en artritis reumatoide

35 **[0159]** Se ha determinado que la interleucina 12 desempeña un papel en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide. Se ha detectado un mensaje inducible de la IL-12p40 en el líquido sinovial de pacientes de artritis reumatoide y se ha demostrado que la IL-12 está presente en líquidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide (véase, p. ej., Morita y col., (1998) *Arthritis and Rheumatism* 41: 306-314).

40 **[0160]** Se ha descubierto la presencia de células IL-12 positivas en el estroma de la membrana sinovial de pacientes de artritis reumatoide. Los anticuerpos, y porciones de anticuerpos, humanos de la invención se pueden usar para tratar, p. ej., artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis de Lyme, espondiloartritis reumatoide, artrosis y artritis gotosa. Normalmente, el anticuerpo, o porción de anticuerpo, se administra sistémicamente, aunque para ciertos trastornos, la administración local del anticuerpo o porción de anticuerpo puede resultar beneficiosa. Un
 45 anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención también se puede administrar con uno más agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

[0161] En el modelo murino de artritis colágena (CIA) para la artritis reumatoide, el tratamiento de ratones con mAb anti-IL-12 (anticuerpo monoclonal de rata anti-IL-12 de ratón, C17.15) anterior a la artritis suprimió
 50 profundamente la aparición, y redujo la incidencia y la gravedad de la enfermedad. El tratamiento con el mAb anti-IL-12 poco después de la aparición de la artritis redujo la gravedad, pero un tratamiento posterior de los ratones con el mAb anti-IL-12 tras la aparición de la enfermedad produjo un efecto mínimo sobre la gravedad de la enfermedad.

8.3 Uso del anticuerpo anti-IL-12 en la enfermedad de Crohn

55 **[0162]** La interleucina-12 también desempeña una función en la enfermedad inflamatoria intestinal conocida como enfermedad de Crohn. El aumento de la expresión del IFN- γ y la IL-12 se produce en la mucosa intestinal de pacientes con la enfermedad de Crohn (véase, p. ej., Fais y col., (1994) *J. Interferon Res.* 14: 235-238; Pyrronchi y col., (1997) *Amer. J. Pathol.* 150: 823-832; Monteleone y col., (1997) *Gastroenterology* 112: 1169-1178; Berrebi y

col., (1998) *Amer. J. Pathol.* 152: 667-672). Se ha demostrado que los anticuerpos anti-IL-12 suprimen la enfermedad en modelos de ratón de colitis, p. ej., colitis originada por TNBS en ratones con el gen de la IL-12 desactivado, y recientemente en ratones con el gen de la IL-10 desactivado. Por consiguiente, los anticuerpos, y porciones de anticuerpos, de la invención se pueden usar en el tratamiento de enfermedades intestinales inflamatorias.

8.4 Uso del anticuerpo anti-IL-12 en la esclerosis múltiple

[0163] Se ha determinado que la interleucina desempeña un papel como mediador clave de la esclerosis múltiple. Se puede demostrar la expresión del mensaje de la IL-12p40 inducible o la propia IL-12 en lesiones de pacientes con esclerosis múltiple. (Windhagen y col., (1995) *J. Exp. Med* 182: 1985-1996; Drulovic y col., (1997) *J. Neurol. Sci.* 147:145-150). Los pacientes crónicos progresivos con esclerosis múltiple presentan niveles elevados de circulación de la IL-12. Las investigaciones con células T y células presentadoras de antígeno (APC) procedentes de pacientes con esclerosis múltiple revelaron una serie de interacciones inmunitarias que se autoperpetúan y que constituyen la base de la esclerosis múltiple progresiva que conduce a una respuesta inmunitaria de tipo Th-1. El aumento en la secreción de IFN- γ de los células T dio lugar a un aumento en la producción de IL-12 por parte de las APC, que perpetuó el ciclo y condujo a un estado crónico de una activación inmunitaria y enfermedad de tipo Th-1 (Balashov y col., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 599-603). Se ha investigado el papel de la IL-12 en la esclerosis múltiple con modelos de ratón y rata de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) para la esclerosis múltiple. En un modelo de EAE de recaída-remisión de la esclerosis múltiple en ratones, el pretratamiento con mAb anti-IL-12 retrasó la parálisis y redujo las puntuaciones clínicas. Por consiguiente, los anticuerpos, o sus porciones de unión al antígeno, de la invención pueden servir para aliviar síntomas relacionados con la esclerosis múltiple en humanos.

8.5 Uso del anticuerpo anti-IL-12 en diabetes mellitus insulino dependiente

[0164] Se ha identificado el papel de la interleucina-12 como mediadora importante en la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID). La DMID se indujo en ratos no específicos mediante la administración IL-12, y los anticuerpos anti-IL-12 fueron protectores en un modelo de transferencia adoptiva de la DMID. En una fase incipiente de la DMID, los pacientes suelen experimentar el denominado periodo de «luna de miel», durante el cual se mantiene una parte de la función de las células de los islotes residuales. Estas células de los islotes residuales producen insulina y regulan los niveles de glucosa en sangre mejor que la insulina administrada. El tratamiento de estos pacientes en fase incipiente con un anticuerpo anti-IL-12 puede evitar el avance de la destrucción de células de los islotes, con lo que se mantiene una fuente endógena de insulina.

8.6 Uso del anticuerpo anti-IL-12 en psoriasis

[0165] Se ha identificado el papel de la interleucina-12 como mediador clave en la psoriasis. La psoriasis causa lesiones cutáneas agudas y crónicas que están relacionadas con un perfil de expresión de citocina de tipo Th-1. (Hamid y col. (1996) *J. Allergy Clin. Immunol.* 1:225-231; Turka y col. (1995) *Mol. Med.* 1:690-699). Se detectaron mARN de la IL-12 p35 y p40 en muestras de piel de humanos enfermos. Por consiguiente, los anticuerpos, o sus porciones de unión al antígeno, de la invención pueden servir para aliviar trastornos cutáneos crónicos como la psoriasis.

8.6 Usos generales del anticuerpo anti-IL-18

[0166] Dada su capacidad para unirse a la IL-18, los anticuerpos anti-IL-18, o porciones de los mismos, de la invención se pueden usar para detectar la IL-18, en un aspecto, la hIL-18 (p. ej., un una matriz de muestra, en un aspecto, una muestra biológica, tal como suero o plasma), mediante un inmunoanálisis convencional, tal como un análisis inmunoenzimático (ELISA), un radioinmunoanálisis (RIA) o inmunohistoquímica. La invención proporciona un procedimiento para detectar la IL-18 en una muestra biológica que comprende la puesta en contacto de una muestra con un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención y la detección del anticuerpo (o porción de anticuerpo) unido a la IL-18 o el anticuerpo (o porción de anticuerpo) no unido, para detectar de ese modo la IL-18 contenida en la muestra. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Entre las sustancias detectables adecuadas se incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Entre los ejemplos de enzimas adecuadas, se incluyen: peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; entre los ejemplos de complejos de grupos prostéticos, se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; entre los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados, se incluyen: umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material

luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen: ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H . La detección de la IL-18 en una muestra puede resultar útil en un contexto diagnóstico, por ejemplo en el diagnóstico de un trastorno relacionado con un aumento en la IL-18 y/o puede resultar útil para identificar a un sujeto para el que podría resultar beneficioso un tratamiento con un anticuerpo anti-IL-18.

5

[0167] Como alternativa al marcado del anticuerpo, se puede analizar la IL-18 de una muestra mediante un inmunoanálisis competitivo en el que se utilizan, p. ej., soluciones estándar de rhIL-18 marcadas con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-18 no marcado, como por ejemplo un anticuerpo anti-hIL-18. En este análisis, la muestra, las soluciones estándar rhIL-18 marcadas y el anticuerpo anti-hIL-18 se combinan y se determina la cantidad de estándar rhIL-18 marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de hIL-18 contenida en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de estándar rhIL-18 marcado unido al anticuerpo anti-IL-18.

[0168] Los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención son capaces de neutralizar la actividad in vivo e in vitro de la IL-18, en un aspecto, una actividad de la hIL-18. Por consiguiente, los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención se pueden usar para inhibir la actividad de la IL-18, p. ej., en un cultivo celular que contiene IL-18, en sujetos humanos u otros mamíferos con IL-18 con la que un anticuerpo de la invención presenta actividad cruzada (p. ej., primates como el babuino, cynomolgus y rhesus). En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humano aislado, o porción del mismo de unión a antígeno, que neutraliza la actividad de la IL-18 humana, y al menos otra IL-18 de primate seleccionada entre el grupo formado por: IL-18 de babuino, IL-18 de tití, IL-18 de chimpancé, IL-18 de cynomolgus e IL-18 de rhesus, pero que no neutraliza la actividad de la IL-18 de ratón. En un aspecto, la IL-18 es IL-18 humana. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene, o del que se sospecha que contiene hIL-18, se puede añadir un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención al medio de cultivo para inhibir la actividad de la hIL-18 en el cultivo.

[0169] En el presente documento se desvela un procedimiento para inhibir la actividad de la IL-18 en un sujeto aquejado de un trastorno en el que la actividad de la IL-18 resulta perjudicial. La interleucina-18 desempeña un papel clave en la patología relacionada con diversas enfermedades en las que entran en juego elementos inmunitarios e inflamatorios.

[0170] Tal como se usa en la presente memoria, se entenderá que la frase «un trastorno en el que la actividad de la IL-18 resulta perjudicial» incluye enfermedades y otros trastornos en los que se ha demostrado que la presencia de IL-18 en un sujeto aquejado del trastorno es o se sospecha que es la responsable de la fisiopatología del trastorno, o bien un factor que contribuye al empeoramiento del trastorno. Por consiguiente, un trastorno en el que la actividad de la IL-18 resulta perjudicial es un trastorno en el que se espera que la inhibición de la IL-18 alivie los síntomas y/o el avance del trastorno. Dichos trastornos se pueden manifestar, p. ej., a través de un aumento en la concentración de IL-18 en un fluido biológico de un sujeto aquejado del trastorno (p. ej., un aumento en la concentración de IL-18 en el suero, plasma, fluido sinovial, etc. del sujeto), que se puede detectar, p. ej., mediante un anticuerpo anti-IL-18, tal como se describe anteriormente. Existen numerosos ejemplos de trastornos en los que la actividad de la IL-18 resulta perjudicial. En un aspecto, los anticuerpos o sus porciones de unión al antígeno se pueden usar en una terapia para tratar las enfermedades o trastornos descritos en la presente memoria. En otro aspecto, los anticuerpos o sus porciones de unión al antígeno, se pueden usar para la fabricación de un medicamento para tratar las enfermedades o trastornos descritos en la presente memoria. El uso de los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención en el tratamiento de unos pocos trastornos específicos no exclusivos se explica más adelante.

45

[0171] En el presente documento se desvelan composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades o trastornos que requieren la modulación de la actividad de la IL-18. Entre estas enfermedades o trastornos se incluyen enfermedades autoinmunitarias, diabetes de tipo 1, artritis reumatoide, rechazos a trasplantes, enfermedad intestinal inflamatoria, septicemia, esclerosis múltiple, cardiopatías isquémicas (incluidos infartos de miocardio), lesiones cerebrales isquémicas, hepatitis crónica, psoriasis, pancreatitis crónica, pancreatitis aguda y similares.

50

[0172] Por consiguiente, los anticuerpos anti-IL-18 o sus porciones de unión al antígeno, o vectores que los expresan in vivo resultan indicados para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, diabetes de tipo 1, artritis reumatoide, rechazos a trasplantes, enfermedad intestinal inflamatoria, septicemia, esclerosis múltiple, cardiopatías isquémicas (incluidos infartos de miocardio), lesiones cerebrales isquémicas, hepatitis crónica, psoriasis, pancreatitis crónica, pancreatitis aguda y enfermedades similares, en las que se da una expresión aberrante de la IL-18, que da lugar a un exceso de IL-18 o en ciertos casos de complicaciones debidas a IL-18 administrada de manera exógena.

55

8.8 Uso del anticuerpo anti-IL-18 en lesiones hepáticas

[0173] En el presente documento se desvelan unos medios novedosos para tratar y/o prevenir lesiones hepáticas. Se ha descubierto que un inhibidor de la IL-18 resulta eficaz para la prevención y el tratamiento de los daños hepáticos. Por lo tanto, la invención también se refiere al uso de un inhibidor de la IL-18 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de las lesiones hepáticas. Más concretamente, la invención se refiere al tratamiento y/o la prevención de lesiones hepáticas provocadas por la hepatitis alcohólica, hepatitis vírica, hepatitis inmunitaria, hepatitis fulminante, cirrosis hepática y cirrosis biliar primaria.

[0174] También se ha descubierto que, de acuerdo con la presente invención, un inhibidor de la IL-18 resulta eficaz en la terapia de la artritis. El efecto terapéutico incluye la disminución de la gravedad de la enfermedad, así como la prevención de la propagación de la enfermedad. Por lo tanto, la invención se refiere al uso de un inhibidor de la IL-18 para el tratamiento y/o prevención de la artritis. Este descubrimiento es inesperado, ya que por el estado de la técnica expuesto en líneas generales anteriormente, no cabría concluir que un bloqueo de un factor concreto involucrado en la artritis, es decir, la interleucina IL-18, daría lugar a un alivio de la artritis o incluso a la curación de una articulación afectada por la artritis.

[0175] El término «artritis» incluye todos los tipos diferentes de artritis y afecciones artríticas, tanto artritis agudas como crónicas, tal como se define, por ejemplo, en la página web sobre la artritis del Departamento de Ortopedia de la Universidad de Washington. Los siguientes son ejemplos de afecciones artríticas: espondiloartritis anquilosante, dolor de espalda, síndrome del túnel carpiano por deposición de materiales, síndrome de Ehlers-Danlos, gota, artritis juvenil, lupus eritematoso, miositis, osteogenia imperfecta, osteoporosis, poliarteritis, polimiositis, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, esclerodermia, artritis con enfermedad intestinal, síndrome de Behçet, artritis infantil, artropatía degenerativa, fibromialgia, artritis infecciosa, enfermedad de Lyme, síndrome de Marfan, artrosis, osteonecrosis, enfermedad de Paget ósea, polimialgia reumática, pseudogota, distrofia simpática refleja, artritis reumatoide, reuma, síndrome de Sjögren, poliposis adenomatosa familiar y similares.

[0176] La artritis reumatoide (AR) provoca inflamación en la capa íntima de las articulaciones (la membrana sinovial, una capa epitelial monocelular) y/u órganos internos. La enfermedad tiende a persistir durante muchos años, normalmente afecta a muchas articulaciones de todo el cuerpo y, en última instancia, puede provocar lesiones en el cartílago, hueso, tendones y ligamentos. Las articulaciones que puede resultar afectadas por la AR son las articulaciones situadas, por ejemplo, en: el cuello, hombros, codos, caderas, muñecas, manos, rodillas, tobillos y pies. En muchos casos, las articulaciones se inflaman siguiendo un patrón simétrico en la AR.

[0177] La AR prevalece en aproximadamente el 1% de la población de EE. UU., distribuida por todos los grupos étnicos y edades. Se da en todo el mundo y, entre los enfermos de AR, las mujeres superan en número a los hombres por 3 a 1.

[0178] Se ha descubierto que la administración de un inhibidor de la IL-18 disminuye de forma considerable la erosión del cartílago en un modelo murino de artritis. De este modo, la presente invención se relaciona también con el uso de un inhibidor de la IL-18 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la destrucción del cartílago.

8.10 Uso general del anticuerpo anti-TNF α

[0179] El factor de necrosis tumoral- α es una citocina proinflamatoria multifuncional secretada predominantemente por monocitos/macrófagos, que posee efectos sobre el metabolismo de los lípidos, la coagulación, la insulinoresistencia, y la función endotelial. El TNF α es un homotrímero soluble de subunidades proteicas de 17 kD. También existe una forma precursora del TNF α de 26 kD unida a la membrana. Se encuentra en las células sinoviales y macrófagos en tejidos. Existen otras células, aparte de los monocitos o macrófagos, que también producen TNF α . Por ejemplo, las líneas celulares tumorales humanas no monocíticas producen TNF α ; así como los linfocitos T CD4+ y CD8+ en sangre periférica y algunos cultivos de líneas de células T y B también producen TNF α . Está relacionado con la artritis reumatoide, aunque no es exclusivo de esta y aparece en muchas enfermedades inflamatorias. Los receptores del TNF α se encuentran en varias células mononucleares, en la membrana sinovial, así como en la sangre periférica y el líquido sinovial. El TNF α es un mediador inflamatorio clave en la artritis reumatoide y, por lo tanto, puede resultar una diana útil para la inmunoterapia específica.

[0180] El TNF α origina acciones proinflamatorias que dan lugar a lesiones en los tejidos, como la degradación del cartílago y el hueso, la inducción de moléculas de adhesión, la inducción de actividad procoagulante en células endoteliales vasculares, el aumento de la adherencia de neutrófilos y linfocitos, y la estimulación de la liberación del

factor de activación plaquetaria desde macrófagos, neutrófilos y células endoteliales vasculares. Las recientes pruebas relacionan el TNF α con infecciones, trastornos inmunitarios, patologías neoplásicas, patologías autoinmunitarias y patologías de injerto contra huésped.

5 **[0181]** Se cree que el TNF α desempeña un papel central en la septicemia por gramnegativos y el choque endotóxico, incluida la fiebre, malestar, anorexia y caquexia. La endotoxina activa intensamente la producción de monocitos/macrófagos y la secreción de TNF α y otras citocinas. El TNF α y otras citocinas derivadas de monocitos median las respuestas metabólicas y neurohormonales a la endotoxina. La administración de endotoxina a voluntarios humanos produce un trastorno agudo con síntomas similares a los de la gripe, que incluyen: fiebre, 10 taquicardia, aumento del ritmo metabólico y liberación de la hormona del stress. La circulación del TNF α aumenta en pacientes que padecen septicemia por gramnegativos.

[0182] De este modo, se ha establecido que el TNF α está relacionado con enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, tumores malignos y/o enfermedades 15 neurodegenerativas y resulta una diana útil para la terapia biológica específica en enfermedades como la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn. Se informó de efectos benéficos en ensayos abiertos con un anticuerpo monoclonal híbrido contra el TNF α , con supresión de la inflamación y con un retratamiento satisfactorio tras a recaída en la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn.

20 **[0183]** Se ha demostrado que los antisueros o mAb neutralizantes para el TNF α en mamíferos anulan cambios fisiológicos adversos y evitan la muerte tras prueba de reto letal en endotoxinemias y bacteriemias experimentales. El Adalimumab (también conocido proteína su nombre comercial HUMIRA®, disponible a través de Abbott Laboratories) es un anticuerpo monoclonal humano recombinante específico para el TNF α . Este anticuerpo monoclonal se une al TNF α y bloquea su interacción con los receptores del TNF α de la superficie celular p55 y p75. 25 Este anticuerpo monoclonal es bastante específico para el TNF α , ya que parece no inhibir la actividad del TNF β . En presencia de un complemento, el adalimumab produce una lisis de la superficie de las células que expresan el TNF α .

EJEMPLOS

30

1. El aislamiento y purificación del anticuerpo anti-IL-12

1.1. Estrategia de purificación

35 **[0184]** Tras finalizar una operación de cultivo celular de producción diseñada para producir anticuerpos contra la IL-12, el caldo se ajustó lentamente y se mantuvo a un pH de 3,5 durante un periodo de 1 hora, después se reajustó hasta un pH de 5 y, a continuación se centrifugó (11.000 xg) para eliminar células e impurezas precipitadas. El sobrenadante del centrifugado se clarificó aún más mediante una etapa de filtración en serie (filtración de profundidad Cuno 90ZA), seguida de filtración de 0,45/0,2 μ m). Tras la clarificación, el anticuerpo fue capturado y se 40 purificó aún más en un procedimiento de cinco etapas.

[0185] El cultivo celular acidificado y clarificado recogido se valoró hasta un pH de 7 con NaOH 3N a lo largo de 30 minutos y se filtró antes de someterlo a cromatografía.

45 **[0186]** Se usó una columna de 1,0 cm diámetro x 21,6 cm de longitud (volumen de lecho 17 mL) para esta operación a escala de banco. En la fase inicial se usó una columna de 1,0 cm x 15,1 cm (volumen de lecho 11,9 mL) para generar material para el transcurso de la purificación fina. Se usó una de columna 20 cm x 21 cm (volumen de lecho 6,6 L) a escala de 300 L. Las columnas se rellenaron con resina MabSelect™ (GE Healthcare, n.º de cat. 17-5199-04, n.º de lote 302070); se midió la asimetría y la altura equivalente de un plato teórico (HETP) para 50 determinar la calidad del relleno.

[0187] La columna se preequilibró con tampón de Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,2. Tras el equilibrado, la columna se cargó con el cultivo celular clarificado recogido ($v = 300$ cm/hora para la carga inicial de 35 g Ab/L de resina, después 150 cm/hora hasta el final de la carga, máximo 40 g/L). Después se lavó la columna con 3 55 volúmenes de columna (VC) de tampón de equilibrado ($v = 300$ cm/hora) seguidos de 3 VC de lavado con tampón de ácido cítrico/citrato de Na 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 6, seguidos de otros 3 VC de tampón de equilibrado. Después se eluyó el producto con ácido acético 0,1 M, NaCl 100 mM, pH 3,5 ($v = 300$ cm/hora). El eluido de la columna se recogió desde una deflexión inicial A280 de 0,1 AU hasta una lectura de 0,1 AU en el frente posterior del pico de elución (celda de flujo con paso de 2 mm) y se valoró hasta un pH de 5 inmediatamente con tampón Tris 1,0 M, pH

10.

[0188] La capacidad de unión dinámica (DBC) de la columna de MabSelect™ se determinó mediante una estrategia de carga de velocidad constante, o bien una estrategia de dos velocidades. La carga de velocidad constante se evaluó a una velocidad de 300 cm/hora durante todo el periodo de carga. La estrategia de carga de dos velocidades se llevó a cabo cargando la columna con hasta 35 mg de proteína/mL de resina a una velocidad lineal de 300 cm/hora, y reduciendo después la velocidad lineal a la mitad para permitir un mayor tiempo de residencia para la última parte de la carga. En cada experimento, la columna se sobrecargó para garantizar la saturación de la columna en las condiciones de carga dadas. El material no retenido en cada tanda se fraccionó para determinar la cantidad total de anticuerpo cargado antes de detectar el 5% en la ruptura. Se obtuvieron los títulos de las fracciones no retenidas (*flow-through* o FT) mediante un análisis por HPLC Poros A™.

[0189] La recuperación se calculó mediante espectrofotometría UV a 280 nm (coeficiente de extinción de 1,42 para una solución de 1 mg/mL, con una longitud de paso de 1 cm) para muestras de elución. Se determinaron los títulos de la carga mediante el análisis por HPLC Poros A™. Se llevaron a cabo cromatografías SEC-HPLC, ELISA HCP y ELISA de proteína A para evaluar la pureza, eliminar las HCP y determinar los niveles de proteína A lixiviada.

[0190] El eluido de MabSelect™ se valoró hasta pH 8 ± 1 con tampón Tris 1M, pH 10, y después se diluyó hasta $6,5 \pm 0,5$ mS/cm con agua. El material diluido se mezcló durante un periodo de una hora, seguido de una filtración con filtros Delipid de Cuno™ y 0,45/0,2 μ m.

[0191] Se usó una columna de 1,0 cm de diámetro x 29 cm de longitud (volumen de lecho 22,8 mL) para la cromatografía Q Sepharose™ Fast Flow a escala de banco. Se usó una columna de 20 cm x 29,5 cm (volumen de lecho 9,27 L) a una escala de 300 L. Las columnas se rellenaron con resina Q Sepharose™ FF (GE Healthcare, Piscataway, NJ, n.º de cat. 17-0510-04, n.º de lote 296307 para la escala de 300 L, n.º de lote 303189 para la escala de banco); se midió la asimetría y la HETP para determinar la calidad del relleno.

[0192] El equilibrado de la resina se logró con Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8. La cromatografía se llevó a cabo en modo de no retención, en el que las impurezas debidas al proceso fueron adsorbidas en la resina y los anticuerpos atravesaban la columna. La carga de la columna se llevó a cabo a 150 cm/hora, y la recogida de la fracción no retenida por la columna (FTW) comenzó cuando la A280 superó las 0,2 AU. Se tomaron muestras del material FTW a intervalos correspondientes a cargas de 30, 50, 80, 90 y 100 g of proteína/L resina. Después se lavó la columna con tampón de equilibrado y la recolección de la FTW continuó hasta que la A280 volvió a una OD de 0,2 AU. La FTW de Q Sepharose™ se diluyó inmediatamente con igual volumen de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,7 M, fosfato de Na 50 mM, pH 7 (SR-343), con el fin de prepararla para cargarla en la columna de Phenyl Sepharose™ HP. Esta solución se filtró con un filtro de 0,2 μ m y se etiquetó como carga Phenyl Sepharose™ HP.

[0193] La recuperación se calculó mediante espectrofotometría UV a 280 nm (coeficiente de extinción de 1,42 para una solución de 1 mg/mL con una longitud de paso de 1 cm). Se llevaron a cabo cromatografías SEC-HPLC, ELISA HCP y ELISA de proteína A para evaluar la pureza, eliminar las HCP y eliminar la proteína A lixiviada.

[0194] Se usó una columna de 1,0 cm de diámetro x 15,6 cm de longitud (volumen de lecho 12,3 mL) para la cromatografía HP con Phenyl Sepharose™ a escala de banco. Se usó una columna de 20 cm x 15,5 cm (volumen de lecho 4,87 L) a la escala de 300 L. Las columnas se rellenaron con resina Phenyl Sepharose™ HP (GE Healthcare, Piscataway, NJ, n.º de cat. 17-1082-04, n.º de lote 298138); se midió la asimetría y la HETP para determinar la calidad del relleno.

[0195] El equilibrado de la resina se logró con fosfato sódico 25 mM, fosfato de amonio 0,85 M, pH 7. La carga máxima de proteína para esta etapa fue ≤ 40 g de proteína por litro de resina ($v = 75$ cm/hora). Tras cargarla, la columna se lavó con 3 volúmenes de columna de fosfato sódico 20 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,1 M, pH 7 (SR-290). El producto se eluyó mediante un gradiente escalonado con fosfato sódico 15 mM, pH 7, sulfato de amonio 0,5 M a una velocidad lineal de 37,5 cm/hora. Se recogió el eluido de la columna a partir de una deflexión A280 de 1,0 AU hasta una lectura de 0,2 AU en el frente posterior del pico de elución.

[0196] La recuperación se calculó mediante espectrofotometría UV a 280 nm (coeficiente de extinción de 1,42 para una solución de 1 mg/mL con una longitud de paso de 1 cm). Se llevaron a cabo cromatografías SEC-HPLC, ELISA HCP y ELISA de proteína A para evaluar la pureza, eliminar las HCP y eliminar la proteína A lixiviada.

[0197] El filtrado vírico con el filtro Ultipor DV20™ no se evaluó a escala de banco ni en la ampliación a escala de

laboratorio debido a la limitación de tamaño a ambas escalas. En cambio, se usó un filtro Ultipor DV50™ a escala de 300 L para generar el material preclínico. A escala de banco, el producto que se eluyó en la cromatografía con Phenyl Sepharose™ se usó directamente para la operación final de ultrafiltración y diafiltración.

5 **[0198]** Se usó un ultrafiltro Millipore de celulosa regenerada con peso molecular de corte (MWCO) de 30 kD para esta etapa (EF/DF). Antes de la operación, el sistema UF se desinfectó con NaOH 1M y se enjuagó con agua.

[0199] El filtrado obtenido con el filtro DV50™ se concentró inicialmente hasta alcanzar 30 mg/mL de proteína. Se llevó a cabo una diafiltración continua con 2 volúmenes (DV) de histidina 5mM, metionina 5 mM, sacarosa al 0,5%,
10 manitol al 2% (p/v), pH 5,9 (tampón de diafiltración) (SR-265). La fracción retenida se concentró aún más hasta alcanzar 40 g/L, después se diafiltró con otros 6 DV del tampón de diafiltración. La fracción retenida se concentró aún más hasta alcanzar ~75 g/L. Después se escurrió el producto del sistema UF y se enjuagó con tampón de diafiltración para recuperar el producto retenido en el sistema. La fracción concentrada y la lavada se combinaron para producir el producto de anticuerpo diafiltrado a ~65 g/L. Este producto se pasó por un filtro de 0,2 µm para
15 prepararlo para el envasado final.

1.2 Análisis de la pureza de la muestra

[0200] SEC-HPLC. La pureza del producto de anticuerpo se evaluó mediante cromatografía de exclusión por
20 tamaño SEC-HPLC.

[0201] Análisis HPLC Poros A. Se determinaron los títulos de los anticuerpos del cultivo, la carga de MabSelect™ y las muestras no retenidas mediante un análisis de captura cuantitativo con Poros A™.

25 **[0202]** ELISA HCP. Los niveles de proteína de célula huésped se evaluaron mediante ELISA de proteína de célula huésped. La HCP se intercaló entre dos anticuerpos específicos en un análisis inmunoenzimático (ELISA).

[0203] La placa se recubrió con 100 µL/pocillo de una mezcla de anticuerpos caprinos anti-CHO purificados por afinidad ((6 µg/mL cada uno en bicarbonato sódico 50 mM, pH 9,4) durante 1 hora a 37° C con agitación a 80 rpm;
30 después se vertió el contenido de la placa y se bloquearon los sitios no específicos con 300 µL/pocillo de caseína durante 1 hora a 37° C con agitación a 80 rpm. Tras el bloqueo, la placa se lavó con tampón de lavado (PBS 1X, Triton X-100 al 0,1%, pH 9). Se prepararon muestras para la curva estándar a partir de la dilución en serie de una alícuota de proteínas de célula huésped CHO de 5,2 mg/mL. El diluyente para todos los reactivos fue caseína, calentada a 37° C y sometida a sonicación durante 2 minutos, a menos que se indique lo contrario. Las
35 concentraciones para la curva estándar fueron: 300, 200, 133, 89, 59, 40, 26, y 18 ng/mL. El estándar de anticuerpo se diluyó 5X y se usó como solución de control del ensayo. Para que el análisis se dé por válido, el valor calculado para el control debe estar en el intervalo de 45 a 76 ng de HCP/mL. Las muestras se diluyeron de manera que los valores calculados quedasen dentro del intervalo de la curva estándar. Las soluciones estándar, la solución de control y las muestras (100 µL/pocillo) se depositaron sobre la placa por duplicado. La placa se incubó a 37° C con
40 agitación a 80 rpm durante 1 hora. Tras la incubación de las muestras, la placa se lavó con tampón y se cargó con 100 µL/pocillo de anticuerpo caprino anti-CHO biotinilado diluido hasta 3 µg/mL. La placa se incubó a 37° C con agitación a 80 rpm durante 1 hora y después se lavó. Se añadieron 100 µL/pocillo de neutravidina-peroxidasa de rábano (HRP) a 100 µg/mL y se incubó la placa a 37° C con agitación a 80 rpm durante 1 hora. Se llevó a cabo un lavado final y la placa se desarrolló con 100 µL/pocillo de sustrato colorimétrico K Blue HRP durante 7 minutos con
45 agitación a velocidad 3 en un agitador de placas de titulación Lab-line a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió al añadir 100 µL/pocillo de ácido fosfórico 2 M y se tomó una lectura de la placa a 450 nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de HCP presente en la muestra analizada.

[0204] ELISA de proteína A. Se evaluó la depuración de proteína A mediante un kit de análisis de Cygnus
50 Technologies Inc. (análisis inmunoenzimométrico para la medición de proteína A en muestras que contienen inmunoglobulina humana, n.º de catálogo F050H). Las soluciones estándar, los reactivos y la placa venían incluidas en el kit. Las muestras se diluyeron hasta 1 mg/mL con PBS 1X y se desnaturalizaron a 100° C durante 5 minutos con tampón desnaturalizador (50 µL de tampón desnaturalizador en 200 µL de muestra). Las muestras se centrifugaron a 6000 xg durante 5 minutos para sedimentar el anticuerpo desnaturalizado. Se añadieron a todos los
55 pocillos 100 µL de anti-proteína A biotinilado y 50 µL de sobrenadante de las muestras desnaturalizadas, soluciones de control y soluciones estándar. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación a 180 rpm. Se aspiró el contenido de los pocillos y se lavó la placa a mano cuatro veces con 300 µL de solución de lavado. Se añadió estreptavidina-fosfatasa alcalina a cada pocillo (100 µL) y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación a 180 rpm. Tras lavar la placa de la manera descrita anteriormente, se añadieron 100

µL de fosfatasa alcalina a los pocillos y la placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación a 180 rpm. Se tomaron lecturas de la placa a 405 y 492 nm. Si la absorbancia de la muestra de 16 ng/mL era < 1,2, la placa se incubaba 30 minutos más y se volvían a tomar lecturas. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de proteína A presente en la muestra analizada.

5

1.3 Resultados de la estrategia de purificación

[0205] Cromatografía de proteína A. Se usó la cromatografía de proteína A con MabSelect™ para capturar anticuerpos anti-IL-12 y reducir el nivel de impurezas debidas al producto y al proceso tales como fragmentos de cadena ligera simple y doble, proteínas de célula huésped de CHO (HCP) y ADN, etc. Los datos contenidos tanto a escala de banco como a escala de biorreactor de 300 L mostraron una buena recuperación de proteína y depuración de HCP (tablas 1 y 2). En la figura 4 se proporciona un cromatograma representativo de la escala de biorreactor de 300 L.

15

Tabla 1: Sinopsis de la recuperación y pureza del nuevo procedimiento a escala de banco

Etapa	Recuperación (%)	Pureza (% monóm.)	HCP (ng/mg Ab)*	Proteína A lixiviada (ng/mg Ab)
Clarificación	91	S. D.**	211195,7	0,14
MabSelect™	95	97,5	1121,9	9,36
Q Seph™ FF	96	96,9	34,5	8,21
Phenyl HP	90	99,2	11,1	0,65
Global	81	S. D.**	S. D.**	S. D.**

* Análisis ELISA de HCP de 1 día. SOP PD-122.
* S. D.: sin determinar

Tabla 2: Sinopsis del nuevo procedimiento a escala de 300 litros

Etapa	Recuperación (%)	Pureza (% monóm.)	HCP (ng/mg Ab)*	Proteína A lixiviada (ng/mg Ab)
Clarificación	91	S. D.**	141753	S. D.**
MabSelect™	95	94,44	< 2117,6	7,6
Filtración Delipid	97	95,97	58	3,4
Q Seph™ FF	93	96,21	8	3,7
Phenyl Seph™ HP	92	99,72	4	2,3
DV50™	95	99,64	S. D.**	S. D.**
UF/DF	99	99,59	S. D.**	S. D.**
Envasado	99	99,55	5	0,3
Global	67	N. A.***	N. A.***	N. A.***

* Análisis ELISA de HCP de 1 día. SOP PD-122.

* S. D.: sin determinar

*** N. A.: no aplicable

[0206] Los datos que se muestran en la tabla 3 demostraron que la capacidad de unión dinámica de la cromatografía con MabSelect™ se veía afectada por el caudal de carga, concretamente por el tiempo de residencia. Cuando la carga se llevó a cabo a una velocidad lineal constante de 300 cm/hora (3,4 minutos de tiempo de residencia), la DBC fue de 44,3 mg de proteína/mL de resina. Cuando se usó la estrategia de carga de dos velocidades (300 cm/hora hasta 35 g/L), el cambio a 150 cm/hora dio lugar a un aumento de la DBC del 17% hasta 51,7 mg de proteína/mL de resina. Este aumento en la DBC se logró doblando el tiempo de residencia para la última porción de la carga. Teóricamente, en la etapa inicial de la carga de la columna, la unión se produce predominantemente en la superficie de la microesfera, en sitios de fácil acceso. Esto permite usar caudales más rápidos sin que apenas afecte a la cinética de la unión. Una vez que se han ocupado todos los sitios de fácil acceso, las proteínas tienen que difundirse dentro de los poros para unirse los sitios menos accesibles. Desde el punto de vista cinético, este es un proceso lento y, por lo tanto, para maximizar la unión se deberían reducir los caudales atendiendo a este factor.

15 Tabla 3: Efecto del caudal sobre la DBC de la columna de MabSelect™

	Velocidad lineal de carga	N.º de experimento	DBC al 5% BT (mg Ab/mL resina)
Carga de velocidad constante	300 cm/hora	Exp. 1	43,7
		Exp. 2	44,9
		Promedio	44,3
Carga de dos velocidades	Velocidad lineal inicial de 300 cm/hora hasta carga de 35 mg Ab/mL de resina, 2ª velocidad lineal de 150 cm/hora hasta la aparición del anticuerpo en la fracción no retenida de la carga	Exp. 3	51,6
		Exp. 4	51,7
		Promedio	51,7

[0207] La cantidad de cadena ligera doble se redujo desde el 0,5% al 0,2% (según la SEC-HPLC) al incluir una etapa intermedia de lavado. Se evaluaron varios tampones de lavado, incluidos: NaCl 0,5 M, acetato sódico 25 mM, NaCl 0,5 M, pH 5,0 o pH 5,5 y ácido cítrico/citrato de Na 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 6. Los datos obtenidos tanto por HPLC-SEC como por SDS-PAGE (figura 5) mostraron una buena depuración de especies de bajo peso molecular (LMW) de todos los experimentos. Cuando se llevó a cabo el lavado a pH 6, se observó la misma depuración de LMW en comparación con los lavados a pH más bajo, mientras que la recuperación de proteína del 95% era comparable a las tandas realizadas sin la etapa intermedia de lavado.

[0208] Cromatografía con Q Sepharose™ Fast Flow. La columna de Q Sepharose™ FF para reducir el nivel de impurezas debidas al producto y al proceso cargadas negativamente, como el ADN y proteínas de células huésped. Esta etapa y las siguientes constituyen las etapas de purificación fina del proceso global.

[0209] Antes de la cromatografía, comenzó la preparación de la muestra de carga con el ajuste del pH y la conductividad del eluido de MabSelect™. Se ajustó el pH del eluido desde pH 5 a pH 8 con Tris 1 M, pH 10; y de inmediato se redujo la conductividad desde ~15 mS a 7 mS con agua. Una vez que la conductividad del eluido de MabSelect™ se aproximó a 7 mS/cm, comenzó a producirse la precipitación y se dejó que continuara durante una hora. El material precipitado se eliminó mediante un filtro de profundidad 30 ZA o Cuno™ Delipid y, a continuación, una filtración de 0,45/0,2 µm. La recuperación de proteína de esta etapa de preparación de carga fue del 96,3%, según la absorbancia a 280 nm, lo que indicaba que la mayoría del material precipitado no contenía anticuerpos. Esto se confirmó mediante un análisis SDS- PAGE de los precipitados (figura 6).

[0210] La columna de Q Sepharose™ FF funcionó en modo de no retención. En la figura 7 se muestra un perfil cromatográfico representativo. No se observó ninguna ruptura aparente de las HCP cuando la carga llegó a 80 g

Ab/L de resina a la escala de biorreactor de 300 L (tabla 4). Una vez que la carga alcanzó los 90 g Ab/L de resina, el nivel de HCP se dobló en la fracción lavada no retenida (FTW), lo cual indicaba que la resina estaba alcanzando su capacidad de unión. Los niveles de HCP siguieron aumentando a una carga de 100 g Ab/L de resina (tabla 4). Esto representa una mejora considerable con respecto al actual procedimiento de fabricación de anticuerpos. La carga máxima es 50 g Ab/L de resina. Esta carga representa un aumento del 60% en la capacidad de unión para la configuración con Q Sepharose™. Este aumento en la capacidad de carga se debe al uso de una resina de afinidad como la proteína A frente a un intercambiador catiónico para la etapa de captura, lo que da lugar a corrientes de alimentación mucho más limpias para la unidad de Q Sepharose™.

10 **[0211]** La recuperación de proteína es típicamente alta para esta etapa. Los datos tanto de las tandas a escala de banco como a escala de biorreactor de 300 L ofrecieron rendimientos comparables en las distintas etapas (96% y 93%) (tablas 1 y 2). También se logró una reducción de HCP (97% y 85%) a ambas escalas (tablas 1 y 2).

Tabla 4: Efecto de la cantidad de carga sobre la depuración de HCP de la columna QFF

15

Cantidad de carga de Q	HCP (ng/mL)*	Ab (mg/mL)	HCP (ng/mg)
Carga de Q filtrada en profundidad	436,306	7,54	58
FTW de Q, 30% de carga**	104,122	8,66	12
FTW de Q, 50% de carga**	61,642	8,59	7
FTW de Q, 80% de carga**	61,867	8,80	7
FTW de Q, 90% de carga**	132,955	8,80	15
FTW de Q, 100% de carga**	157,683	8,52	17
Conjunto de FTW de Q	62,808	8,24	8

* Análisis ELISA de HCP de 1 día. SOP PD-122.
 ** 100% de carga = carga de 100 g Ab/L de resina

20 **[0212]** Cromatografía HIC. Se usó una cromatografía HIC para eliminar moléculas de anticuerpos agregados y fragmentados, separándolas de los anticuerpos intactos en virtud de su diferente hidrofobia. En el caso de los anticuerpos anti-IL-12, los agregados son más hidrófobos que los monómeros y, por tanto, se unen más fuertemente a la columna HIC. Cuando la columna se eluye con sulfato de amonio 0,5 M, el Ab monomérico atraviesa la columna, mientras que los agregados permanecen unidos a la columna y solo se desprenden en la eliminación con agua. En cambio, las moléculas de anticuerpos fragmentados o especies de bajo peso molecular (LMW) son menos hidrófobas que los anticuerpos intactos y, por tanto, no se unen tan fuertemente a la resina cromatográfica HIC. La mayoría de las LMW salen de la columna antes de alcanzar el pico de elución principal. Debido a que en la etapa
 25 previa de lavado de MabSelect™ se logró eliminar la mayoría de las LMW del flujo del proceso, el proceso de HIC fue diseñado principalmente para eliminar anticuerpos agregados, fracciones lixiviables de proteína A, HCP residuales y otras impurezas debidas al producto y al proceso, para cumplir las especificaciones del producto final. En la figura 8 se proporciona un perfil de elución cromatográfico representativo.

30 **[0213]** Los datos obtenidos tanto a escala banco como a escala de 300 L mostraron una recuperación $\geq 90\%$, y una buena eliminación de agregados ($> 99\%$ de pureza) mediante la cromatografía HIC (véanse las tablas 1 y 2). La proteína A lixiviada en el material de la FTW Q se redujo desde 8,21 a 0,65 ng/mg Ab (ppm) mediante el empleo de la cromatografía HIC (véase la tabla 1).

35 **[0214]** En comparación con el actual procedimiento de elaboración (p. ej., captura por intercambio catiónico), con el proceso basado en la captura por afinidad de la proteína A se logró purificar anticuerpos anti-IL-12 procedentes del cultivo de células de CHO con un mayor rendimiento y mejor eliminación de HCP.

2. Aislamiento y purificación del anticuerpo anti-TNF α

2.1. Estrategia de purificación

[0215] Clarificación de recolección de cultivo celular. En este ejemplo, se usó como material de partida caldo de recolección de fermentación de 13 días de cultivo celular y un material de recolección de fermentación de 15 días clarificado. El caldo de cultivo celular se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos con una centrifugadora Beckman Coulter Allegra™ 6R. El sobrenadante recogido se filtró a través de un filtro Delipid (CUNO ZeraPlus® BC0030A DELI - cápsula desechable BioCap™ 30) con un caudal de 20 mL/min. Después, la recolección clarificada se dividió en alícuotas y se almacenó a -80° C. La recolección congelada se descongeló y se filtró con un filtro de acetato de celulosa Corning® de 0,22 µm antes de cargarlo en la columna. El caldo de recolección se centrifugó con una centrifugadora de discos y se continuó filtrando a través de un filtro de profundidad y un filtro Delipid. El filtrado se almacenó a 4° C antes de cargarlo en la columna. El proceso de clarificación se llevó a cabo a temperatura ambiente.

[0216] Cromatografía de afinidad con proteína A. Se cargó una columna de 10mL (1,6 x 5cm) y una columna de 40,2 mL (1,6 x 20cm) con resina MabSelect™ (GE Healthcare). Se usó un sistema cromatográfico AKTA Explorer™ para llevar a cabo las operaciones. Las columnas se rellenaron con NaCl 0,5 M. En la tabla 5 se muestran las condiciones cromatográficas. Las fracciones del pico de elución se combinaron y se mantuvieron durante 1 hora antes de neutralizarlas hasta pH 8,0 con trolamina 3M. El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Tabla 5. Condiciones de la cromatografía de afinidad con proteína A

Etapa	Solución	Volumen	Velocidad lineal*
		(VC)	(cm/h)
Enjuague	Agua	5	400
Equilibrado	1 x PBS	5	400
Carga	Consulte la información de la muestra	Variable	400
Lavado	1 x PBS	5	400
Elución	Tampón de ácido acético con pH 3,2	5	400
Regeneración	Ácido acético al 1,0%/NaCl 0,5M	5	400
Desinfección en cada ciclo	Guanidina 6,0M	5	400
Enjuague	Agua Milli-Q	5	400
Almacenamiento	Acetato de Na 50 mM, pH 5, etanol al 20%	3	100

* La velocidad lineal fue de 100 cm/h para una columna de 5 cm de altura y 400 cm/h para una columna de 20 cm de altura para mantener el mismo tiempo de residencia.

[0217] Preparación del material de carga Q. Los eluidos neutralizados obtenidos en las dos tandas de proteína A se combinaron y se eluyeron con aproximadamente 0,5 ~ 1,0 time con agua Milli-Q para lograr una conductividad de 4,5 ~ 5,5 mS/cm (25° C). La muestra diluida se filtró a través de un filtro de profundidad (CUNO Zeta Plus BioCap® BC0030A30ZA) a un caudal de 20 mL/min; a continuación, con un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm (Corning, Inc.) y después con un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm (Corning, Inc.). Tras este paso, la muestra estaba lista para cargarla en la columna Q.

[0218] Cromatografía de intercambio aniónico con Q Sepharose™. Se rellenó una columna de 60,3 mL (1,6 x 30 m) y una columna 40,2 mL (1,6 x 20 cm) con resina Q Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare) y se empleó un sistema cromatográfico AKTA Explorer™. En la tabla 6 se muestran las condiciones cromatográficas. El proceso se

llevó a cabo a 12° C. Se recogieron muestras no retenidas por la columna para su purificación cromatográfica con Phenyl HP.

Tabla 6. Condiciones de la cromatografía con Q Sepharose

5

Etapa	Solución	Volumen	Velocidad lineal
		(VC)	(cm/h)
Equilibrado	Trolamina 25 mM, NaCl 40 mM, pH 8,0	5	149
Carga	Consulte la información de la muestra	Variable	149
Lavado	Trolamina 25 mM, NaCl 40 mM, pH 8,0	5	149
Regeneración	NaPi 25 mM, NaCl 1 M, pH 7,0	3	149
Enjuague	Agua WFI	2	149
Desinfección en cada ciclo	NaOH 1M	3	74,6
Enjuague	Agua WFI	3	74,6
Almacenamiento	NaPi 250 mM, pH 5, iPrOH al 20%	5	74,6

[0219] Cromatografía con Phenyl Sepharose™ HP. Se rellenó una columna de 30,2 mL (1,6 x 15 cm) con resina Phenyl Sepharose™ HP (GE Healthcare) y se empleó un sistema cromatográfico AKTA Explorer™. La solución no retenida Q se diluyó con (NH₄)₂SO₄ 2,2 M/NaH₂PO₄ 40 mM en una proporción de 1:1 para lograr una conductividad de 147 11 mS/cm para cargarla en la columna de Phenyl Sepharose™ HP. Se recogió el pico de elución principal. En la tabla 7 se muestran las condiciones cromatográficas. El proceso se llevó a cabo a 12° C.

Tabla 7. Condiciones de la cromatografía con Q Sepharose

Etapa	Solución	Volumen	Velocidad lineal
		(VC)	(cm/h)
Equilibrado	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,1 M/Na-PO ₄ 20 mM	5	75
Carga	Consulte la información de la muestra	Variable	75
Lavado	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,1 M/Na-PO ₄ 20 mM	5	75
Elución	AmSO ₄ 0,6 M-0,65 M, NaPi 11,4 mM	3	37,5
Regeneración	NaPO ₄ 25 mM, iPrOH al 20%	3	37,5
Enjuague	Agua Milli-Q	3	37,5
Desinfección en cada ciclo	NaOH 1M	3	37,5

15

2.2. Análisis de pureza de la muestra

[0220] pH. Se calibró un pehachímetro con dos soluciones de pH estándar (pH 4 y pH 7 o pH 7 y pH 10) justo antes de su uso. Los valores medidos se encontraban dentro de los puntos de calibrado. Se utilizó un pehachímetro Corning Pinnacle 545.

20

[0221] Conductividad. Se midió la conductividad a 25° C, mediante un medidor de conductividad Radiometer Analytical CDM 210.

5 **[0222]** Espectroscopia UV A₂₈₀. Se midió el espectro UV a A₂₈₀ mediante un espectrofotómetro Agilent UV8453. El coeficiente de extinción usado para el adalimumab es 1,39 L/g·cm.

[0223] HPLC de Poros A. La concentración del anticuerpo se determinó mediante HPLC de Poros A (proteína A). Se aplicaron las diluciones de muestra para obtener lecturas comprendidas en el intervalo de calibrado. Se configuró un sistema HPLC Shimadzu con un cartucho detector Poros A ImmunoDetection (Applied Biosystems, Foster City, CA). La columna se mantuvo a temperatura ambiente. El sistema trabajó con un caudal de 2 mL/minuto. La temperatura de la bandeja del automuestreador se ajustó a 4° C. Se detectó la absorbancia a 280 nm. El tampón A era 1 x PBS. El tampón B era ácido acético 0,1 M y cloruro sódico 150 mM. Se inyectó la muestra y se eluyó el adalimumab con tampón B al 100%.

15

[0224] HPLC WCX-10. Se llevó a cabo un análisis mediante HPLC WCX-10 (WCX: intercambio catiónico débil). Se configuró un sistema HPLC Shimadzu con una columna analítica Dionex ProPac WCX-10 y una precolumna (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA). Ambas columnas se mantuvieron a 30° C. El sistema trabajó con un caudal de 1 mL/minuto. La temperatura de la bandeja del automuestreador se ajustó a 4° C. Se detectó la absorbancia a 280 nm. El tampón A era fosfato sódico dibásico 10 mM, pH 7,5. El tampón B era fosfato sódico dibásico 10 mM/ cloruro sódico 550 mM, pH 5,5. Se inyectó la muestra y se eluyó el adalimumab mediante el siguiente procedimiento en gradiente.

20

Tiempo (min.)	Tampón A (%)	Tampón B (%)
0,0	94	6
20,0	84	16
22,0	0	100
26,0	0	100
28,0	94	6
34,0	94	6

25 **[0225]** Cromatografía de exclusión por tamaño HPLC (SEC). Se llevó a cabo un análisis por SEC. Se aplicaron las diluciones de muestra para obtener lecturas comprendidas en la curva estándar. Se configuró un sistema HPLC Shimadzu con una columna Superose™ 6 10/300 GL (GE Healthcare). La columna se mantuvo a temperatura ambiente. El sistema trabajó con un caudal de 0,5 mL/minuto. La temperatura de la bandeja del automuestreador se ajustó a 4° C. Se detectó la absorbancia a 214 nm. El tampón A era fosfato sódico dibásico 20 mM/ cloruro sódico 150 mM. Se inyectó la muestra y el adalimumab se separó isocráticamente con tampón A al 100%.

30

[0226] ELISA HCP. Se llevó a cabo un análisis ELISA de HCP tal como se explica anteriormente. Se aplicaron las diluciones de muestra para obtener lecturas comprendidas en el intervalo de calibrado.

35 **[0227]** Análisis ELISA de proteína A. Se llevó a cabo un análisis de la concentración de proteína A lixiviable tal como se explica anteriormente. Se adquirieron muestras de análisis inmunoenzimométrico para la medición de proteína A que contenían kits de análisis de inmunoglobulina humana previamente recubiertos (n.º de catálogo F050H) que incluyen el diluyente de muestras (n.º de catálogo 1028) de Cygnus Technologies, Inc. Se usó un bloque de calentamiento (Type 17600 Dri-Bath, Barnstead/ThermoLyne) para desnaturalizar la muestra. Se usó un incubador (máx. 4000, Barnstead/Lab-Line) para incubar las muestras. Se usó un lector de placas (Spectramax Plus, Molecular Devices) para tomar lecturas de la absorbancia a 405 nm y 495 nm.

40

[0228] SDS-PAGE. Las muestras se diluyeron con tampón PBS 1X hasta alcanzar una concentración predeterminada, después se añadió un volumen igual de tampón de carga 2X (Invitrogen™ Novex® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2X), n.º de cat. LC2676) a cada muestra diluida. Para la reducción del SDS-PAGE, se añadió en cada muestra una décima parte de volumen de reductor (Invitrogen™ NaPAGE® Sample Reducing Agent (10X), n.º de cat. NP0004). Se aplicaron 20 µL de cada muestra preparada en cada pocillo sobre el gel (Invitrogen™ 12%

45

Tris-Glycine Gel). La separación en gel se llevó a cabo con un tampón de separación Tris/glicina/SDS 1X (diluido a partir de tampón TrisGlycine-SDS 10X de ABC Storage Room) a una tensión constante de 125 V y 35 mA durante 108 minutos. Se usó SimpleBlue™ SafeStain (invitrogen™, Cat# LC6060) para teñir el gel durante 2 horas y se destiñó con agua Milli-Q hasta la aparición de bandas decoloradas. En este estudio se usó SeeBlue® Plus 5 Prestained Standard (1X) (invitrogen™ n.º de cat. LC5925) como marcador. Cada muestra preparada se cargó aplicando la misma cantidad total de anticuerpo.

2.3 Resultados de la estrategia de purificación

10 **[0229]** Capacidad de unión dinámica de MabSelect™. La capacidad de unión dinámica de una resina en condiciones determinadas se puede estimar mediante la sobrecarga de la columna y el análisis de la ruptura resultante del producto. Normalmente, el ajuste para la máxima capacidad de unión consiste en determinar la carga correspondiente al 10% de ruptura y reducirla después de un 10% a un 20% como margen de seguridad para garantizar la variabilidad de mediciones del proceso y el ligando de proteína A lixiviado con el tiempo que se va
15 cubrir. El punto de ruptura del 10% para la resina MabSelect™ está en 37,4 g de anticuerpo por L de resina (figura 9). Esto sugeriría una máxima capacidad de unión recomendada de la resina de 32 g/L de resina con un caudal de 400 cm/hora en las condiciones estudiadas. En este ejemplo, la cantidad de carga que se usó fue de 32 g/L.

[0230] Rendimiento de la recuperación de anticuerpos. Se llevaron a cabo dos tandas para el rendimiento del producto y el estudio de la calidad. Los caldos de recolección se clarificaron tal como se describe anteriormente. Los
20 filtrados se cargaron en la columna MabSelect™ y se sometieron a la separación. Los pH de los eluidos (pH 4,06) fueron que el pH de reducción/inactivación vírica suficiente (pH 3,5), por lo tanto el conjunto de eluidos se ajustó a un pH de 3,5 con ácido acético glacial diluido 10X (J. T. Baker 9522-03). En la etapa de cromatografía de Q Sepharose™, se cargaron 30 g/L en la tanda 1 y 40 g/L en la tanda 2 para probar la capacidad de depuración de
25 impurezas del proceso.

[0231] En la tabla 8 se recogen los rendimientos de las etapas de recuperación de anticuerpos a partir de estas dos tandas y un proceso para la purificación en el que no se emplea la proteína A («AY-04»).

30 **Tabla 8: Rendimientos de recuperación en el proceso de proteína A estudiado y el proceso AY-04**

Nombre de la etapa	Proceso de Proteína A		AY-04
	Tanda 1	Tanda 2	Datos de mapeado*
Filtrado de recolección			
Captura de proteína A	91,81	97,12	86~91%
Filtración inactiva de virus	91,00	97,65	97~98%
CC Q Sepharose™	93,87	95,91	88~101%
CC Phenyl Sepharose™	91,57	96,63	87~91%
Global de la cromatografía	71,81	87,90	72~82%
* Datos del informe técnico ABC/TO R348			

[0232] Las proteínas de célula huésped (HCP) son las principales impurezas generadas por las células CHO. Además de las impurezas contenidas en el material de recolección, la proteína A puede lixiviarse desde la matriz de
35 resina de proteína A y pasar a la mezcla del producto, a modo de impureza debida al proceso. Un buen proceso debe demostrar su capacidad para depurar las HCP y la proteína A lixiviable.

[0233] Depuración de HCP. Se aplicó el material de recolección del lote a una columna MabSelect™ (2,6 x 20 cm). Se midieron los niveles de HCP tal como se describe anteriormente y se compararon con el eluido de Fractogel™ en
40 un proceso AY-04. Los datos demostraron que la cromatografía con MabSelect™ eliminó el 99,9% de las HCP cargadas y la cromatografía con Fractogel™ S de AY-04 eliminó 88 ~ 93% de la HCP cargada. Tal como se esperaba, la resina de afinidad de proteína A presentó una mejor capacidad de depuración que la resina de intercambio catiónico Fractogel™ S.

[0234] Fracciones lixiviables de proteína A. para detectar la proteína A lixiviada desde la matriz de resina, se usó un kit comercial de ELISA (Cygnus Technologies, Inc) para determinar el contenido de proteína A. La proteína A lixiviada durante la etapa de afinidad fue aproximadamente 6 ng/mg-anticuerpo en el eluido. Tras la purificación fina con Q Sepharose™ y Phenyl HP, la proteína A lixiviada se redujo de manera considerable hasta aproximadamente 5 0,02 ng/mg.

[0235] SDS-PAGE. Se realizó una SDS-PAGE reductora desnaturalizante para comparar las diferencias inmediatas entre el proceso de proteína A y el proceso de AY-04. Se cargaron 2 µg de anticuerpo de cada muestra. No se observó ninguna diferencia evidente en el gel (figura 10).

[0236] Estudio de elución de MabSelect™. En el caso de la resina de afinidad de proteína A, el anticuerpo se une a pH neutro y se eluye en condiciones ácidas. Debido a que un bajo pH de reducción/inactivación resulta muy eficiente y se usa de manera generalizada en procesos de purificación de anticuerpos monoclonales, la etapa de reducción/inactivación de virus se puede simplificar manteniendo el eluido de MabSelect™ durante el tiempo suficiente. Se estudió el efecto del pH de la elución sobre el rendimiento de la recuperación de anticuerpos y sobre la calidad del producto. Se escogió un pH aproximado de 3,2 como pH de elución de MabSelect™ en virtud de su superior rendimiento de recuperación y aceptable calidad de producto en lo que respecta al porcentaje de monómeros y las variantes de lisina totales.

[0237] En la figura 11 se demuestra que se obtuvo un rendimiento de al menos el 90% para un intervalo de pH de elución de 2,5 a 3,8 y se produce una disminución considerable en el rendimiento a pH 4. Esto sugiere que un pH del tampón de elución mayor que pH 4 no podría eluir suficientemente el anticuerpo de la resina MabSelect™.

[0238] Impacto sobre la agregación de anticuerpos. Todos los niveles de monómeros de anticuerpo (Adalimumab) en los eluidos de MabSelect™ fueron superiores al 92% (figura 12). Todos cumplían los límites de actuación en proceso (monómeros en HPLC SEC ≥ 92%) de la cromatografía con Fractogel™ en el proceso de AY-04 con un intervalo de pH de tampón de elución de 2,5 a 3,8, aunque un mayor pH de elución generó menos agregados. El periodo de tiempo durante el que se mantuvo el eluido en condiciones ácidas, de 1 a 3 horas, no afectó de manera significativa a la agregación de anticuerpos.

3. Determinación de la concentración de proteína de célula huésped en composiciones de anticuerpo anti-IL-12

[0239] Este procedimiento describe la metodología de ensayo para la determinación de la concentración de proteína de célula huésped residual en muestras de anticuerpo anti-IL-12. Se usa un inmunoanálisis enzimático sobre adsorbente (ELISA) para intercalar la proteína de célula huésped (antígenos) entre dos capas de anticuerpos específicos. A continuación, se efectúa el bloqueo de sitios no específicos con caseína. Después se incuban las proteínas de célula huésped y, durante ese tiempo, las moléculas de antígeno son capturadas por el primer anticuerpo (anticuerpo de recubrimiento). Después se añade un segundo anticuerpo (anti-proteína de célula huésped biotinilado) que se fija al antígeno (proteínas de célula huésped). Se añade un conjugado de neutravidina-HRP que se une al anticuerpo anti-proteína de célula huésped biotinilado. A continuación, se añade sustrato K Blue. El sustrato cromógeno es hidrolizado por el anticuerpo conjugado, lo cual produce un color azul. Se interrumpe la reacción con H₃PO₄ 2M y el color cambia a amarillo. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de antígeno unido en el pocillo.

[0240] Preparación de bicarbonato sódico 50 mM (tampón de recubrimiento), pH 9,4. En un vaso de precipitados de 1 L se añaden: 900 mL de agua Milli-Q; 4,20 g ± 0,01 g de bicarbonato sódico. Agitar hasta su total disolución. Ajustar el pH a 9,4 con NaOH 1 N. Transferir a un matraz aforado de 1 L y enrasar con agua Milli-Q. Mezclar por inversión hasta lograr la homogeneidad. Filtrar a través de una unidad de filtro estéril de 0,22 µm. Almacenar a una temperatura nominal de 4°C durante un periodo de hasta 7 días desde la fecha de preparación.

[0241] Preparación de Na₂HPO₄ * 7H₂O 0,104 M, NaCl 1,37 M, KCl 0,027 M, KH₂PO₄ 0,0176 M, pH = 6,8 – 6,9 (PBS 10X). Añadir aproximadamente 400 mL de agua Milli-Q a un vaso de precipitados de vidrio. Añadir 13,94 g ± 0,01 g de Na₂HPO₄ x 7H₂O. Añadir 40,0 g ± 0,1 g de NaCl. Añadir 1,00g ± 0,01 g de KCl. Añadir 1,20 g ± 0,01 g de KH₂PO₄. Agitar hasta lograr la homogeneidad. Transferir a un matraz aforado de 500 mL. Completar hasta un volumen de 500 mL con agua Milli-Q. Mezclar por inversión. Filtrar a través de una unidad de filtro estéril de 0,22 µm. Almacenar a temperatura ambiente durante un periodo de hasta 7 días.

[0242] Preparación de PBS 1X + Triton X-100 al 0,1%, pH 7,40: (tampón de lavado de placa). En un tubo

graduado de 4 L, mezclar 400 mL de PBS 10 X (etapa 5.2) con 3500 mL de agua Milli-Q. Comprobar el pH, y ajustar si fuera necesario hasta $7,40 \pm 0,05$ con HCl 1 N o NaOH 1 N. Enrasar con agua Milli-Q. Sellar bien el tubo con Parafilm y mezclar por inversión hasta lograr la homogeneidad. Transferir a un frasco de 4 L. Retirar 4 mL del PBS 1 X y desecharlos. Añadir 4 mL de Triton X-100 a los 3996 mL de PBS 1 X. Colocar en un agitador de placas y agitar hasta lograr su total disolución. Filtrar la cantidad de tampón de lavado de placa necesaria para la preparación del tampón de dilución a través de una unidad de filtro estéril de $0,22 \mu\text{m}$. Almacenar a temperatura ambiente durante un periodo de hasta 7 días.

[0243] Preparación de la mezcla de anticuerpos de recubrimiento: anti-CHO caprino 599/626/748 (n.º de lote G11201 a $1,534 \text{ mg/mL}$), purificado por afinidad. NOTA: Las soluciones madre se almacenan a una temperatura nominal de -80°C en viales. Preparar alícuotas. Tomar una alícuota por placa en el momento de su uso. Justo antes de su uso: Diluir la mezcla de anticuerpos para lograr una concentración final de $4 \mu\text{g/mL}$ en bicarbonato sódico 50 mM frío, del siguiente modo. Por ejemplo: añadir $31 \mu\text{L}$ s de mezcla de anticuerpos de recubrimiento a $11969 \mu\text{L}$ s de tampón de recubrimiento frío. Mezclar cuidadosamente mediante inversión.

[0244] Preparación de la mezcla de anticuerpos caprinos biotinilados contra la proteína de célula huésped, 599/626/748 (n.º de lote G11202 a $0,822 \text{ mg/mL}$). NOTA: Las soluciones madre se almacenan a una temperatura nominal de -80°C en viales. Preparar alícuotas. Tomar una alícuota por placa en el momento de su uso. Justo antes de su uso: Diluir la mezcla de anticuerpos biotinilados para lograr una concentración final de $1 \mu\text{g/mL}$ en caseína a $37^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$, del siguiente modo. Por ejemplo: añadir $14,6 \mu\text{L}$ s de mezcla de anticuerpos biotinilados a $11985 \mu\text{L}$ s de caseína a $37^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$. Mezclar cuidadosamente mediante inversión.

[0245] Preparación de Neutravidina-HRP. Reconstituir los nuevos lotes (2 mg/vial) hasta 1 mg/mL , del siguiente modo: Añadir $400 \mu\text{L}$ de agua Milli-Q al vial y después añadir $1600 \mu\text{L}$ de PBS 1X para un total de 2 mL . Agitar cuidadosamente en vórtex para mezclar. Almacenar a una temperatura nominal de -20°C . Preparar alícuotas con el volumen deseado, de manera que se use 1 alícuota por placa. Preparar en tubo de polipropileno. Cualificar nuevos lotes para determinar la concentración de trabajo. Asignar un periodo de validez de 6 meses tras la fecha de preparación. Por ejemplo, si se determina que la concentración de trabajo era de $0,2 \mu\text{g/mL}$, entonces se prepara de siguiente modo: Justo antes de su uso: descongelar una alícuota de neutravidina-HRP a temperatura ambiente. Diluir la disolución de 1 mg/mL neutravidina hasta $0,1 \text{ mg/mL}$ ($100 \mu\text{g/mL}$) con caseína a $37^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$. Por ejemplo: Diluir $\times 10$, añadir $50 \mu\text{L}$ de neutravidina a $450 \mu\text{L}$ de caseína. Agitar cuidadosamente en vórtex para mezclar. Diluir aún más la solución de $100 \mu\text{g/mL}$ hasta $0,2 \mu\text{g/mL}$ con caseína a $37^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$. Por ejemplo: Diluir $\times 500$, añadir $24 \mu\text{L}$ de neutravidina ($100 \mu\text{g/mL}$) a $11976 \mu\text{L}$ de caseína. Agitar cuidadosamente en vórtex para mezclar.

[0246] Preparación de ácido fosfórico 2M de la etapa 5.7 (solución de interrupción). Preparar una solución de ácido fosfórico 2M a partir de ácido fosfórico concentrado, del siguiente modo. A partir del % del ácido fosfórico indicado en la etiqueta, densidad ($1,685 \text{ g/mL}$) y peso de fórmula (98 g/mol), calcular el volumen de ácido fosfórico concentrado necesario para preparar 500 mL de ácido fosfórico 2M. Añadir al matraz el volumen de ácido fosfórico concentrado calculado. Enrasar con agua Milli-Q y mezclar mediante inversión hasta lograr la homogeneidad. Almacenar a temperatura ambiente durante un periodo de hasta 6 meses desde la fecha de preparación.

[0247] Preparación del tampón de dilución (caseína diluida $\times 100$ en PBS 1X + Triton X100 al $0,1\%$, pH 7,4). Diluir caseína a $37^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$ $\times 100$ en $0,22 \mu\text{m}$ de 1X PBS + $0,1 \%$ Triton X100, pH 7,4 (de la preparación anterior) esterilizado y filtrado. Por ejemplo: Añadir 1 mL de caseína a $37^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$ a 99 mL $0,22 \mu\text{m}$, de PBS 1X + Triton X100 al $0,1 \%$, pH 7,4. Mezclar bien. Elaborar una preparación nueva para cada uso.

[0248] Preparación de soluciones estándar. Soluciones estándar de proteína de célula huésped (soluciones estándar de antígeno) (n.º de lote G11203 a $1,218 \text{ mg/mL}$). NOTA: Las soluciones madre se almacenan a una temperatura nominal de -80°C en alícuotas de $70 \mu\text{L}$. Descongelar una alícuota a temperatura ambiente. Llevar a cabo diluciones seriadas en tubos de polipropileno con el tampón de dilución.

[0249] Preparación de muestras. Diluir en tubos de polipropileno muestras a granel finales hasta 24 mg/mL en el tampón de dilución. Registrar la concentración. NOTA: usar las siguientes soluciones para preparar muestras enriquecidas y para preparar las soluciones de 12 mg/mL a las que se hace referencia más adelante. Diluir aún más en microtubos de polipropileno las soluciones de 24 mg/mL hasta 12 mg/mL en el tampón de dilución. Cargar en la placa los pocillos por triplicado por cada una de las soluciones de 12 mg/mL para un total de 6 pocillos.

[0250] Preparación del aditivo. En un microtubo de polipropileno, preparar un aditivo de proteína de célula huésped de 10 ng/mL a partir de la solución estándar de 20 mg/mL preparada anteriormente diluyéndola $\times 2$ con el

tampón de dilución. Cargar en la placa tres pocillos para la solución de aditivo. Usar la solución estándar de 20 ng/mL de la etapa 6.1 para enriquecer las muestras.

[0251] Preparación de muestras enriquecidas. En microtubos de polipropileno, enriquecer 300 μ L de cada una de las soluciones a granel finales de 24 mg/mL con 300 μ L de la solución de aditivo de 20 ng/mL (6.1). Cargar los pocillos por triplicado por cada una de las soluciones de aditivo, para un total de 6 pocillos.

[0252] Preparación del control. Se debe establecer un intervalo de control para cada nueva solución de muestra enriquecida, antes de utilizarla en un ensayo de rutina. Solución madre de control: Preparar alícuotas de 150 μ L de un lote de concentrado del fármaco ABT-874 y se almacenan a una temperatura nominal de -80° C durante un periodo de hasta tres años.

[0253] Preparación del control de trabajo. Descongelar una alícuota del control a temperatura ambiente. Diluir en microtubos de polipropileno el control hasta 24 mg/mL con el tampón de dilución. Diluir aún más, en microtubos de polipropileno, la solución de control de 24 mg/mL con tampón de dilución hasta 12 mg/mL. Preparar una única dilución y cargar el control en 3 pocillos de la placa.

[0254] Procedimientos de ELISA. Llenar el frasco de lavado con el tampón de lavado de placa (ver etapa 5.3, PBS X1 + Triton X-100 al 0,1%). Cegar el lavador de placas. Comprobar los siguientes parámetros: El ajuste de los parámetros debe ser: Tipo de placa: 1 para cada ciclo (un total de 5 ciclos): Volumen: 400 μ L; Tiempo de remojo: 10 segundos; tiempo de aspiración: 4 segundos.

[0255] Procedimiento de análisis. Recubrir las placas con 100 μ L/pocillo de una mezcla de 4 μ g/mL de anticuerpos caprinos de recubrimiento en bicarbonato sódico 50 mM frío. Golpear suavemente un lado de la placa hasta que la solución de recubrimiento cubra la parte inferior de los pocillos de manera uniforme, cubrir con cinta selladora e incubar a una temperatura nominal de 4° C con agitación en un agitador de placas (o equivalente) a velocidad 3 durante 18 horas \pm 1 hora. Tras incubar toda la noche, retirar la placa del refrigerador y dejar que se equilibre hasta alcanzar la temperatura ambiente. Sacudir para retirar el recubrimiento. Transferir la placa sobre toallas de papel. Bloquear con 300 μ L/pocillo de caseína a 37° C \pm 2° C, cubrir con cinta selladora e incubar a 37° C \pm 2° C con agitación en un agitador de placas Lab-Line Environ (o equivalente) a 80 rpm \pm 5 rpm durante 1 hora. Preparar la solución estándar, la muestra, el control, el aditivo y las muestras enriquecidas durante la incubación de bloqueo. Lavar la placa 5 veces con el tampón de lavado. Transferir la placa sobre toallas de papel. Con una pipeta de 8 canales, pipetear 100 μ L/pocillo de soluciones estándar, muestras, aditivos, muestras enriquecidas y el control por triplicado en los pocillos de la placa. Pipetear 100 μ L/pocillo del tampón de dilución en todos los pocillos vacíos de la placa para que hagan las veces de blanco. Cubrir con cinta selladora e incubar a 37° C \pm 2° C con agitación sobre un agitador de placas Lab-Line Environ (o equivalente) a 80 rpm \pm 5 rpm durante 1 hora. Rellenar una plantilla para utilizarla como guía al cargar la placa.

[0256] Configuración del lector de placas. Configurar la plantilla, introduciendo las concentraciones de las soluciones estándar. No introducir factores de dilución para las muestras, el control, el aditivo o las muestras enriquecidas. Asignar los pocillos que contienen diluyente como blancos que se deben sustraer de todos los pocillos. Lavar la placa 5 veces con el tampón de lavado. Transferir la placa sobre toallas de papel. Añadir 100 μ L/pocillo de anticuerpo caprino biotinilado. Cubrir con cinta selladora e incubar a 37° C \pm 2° C con agitación en un agitador de placas Lab-Line Environ (o equivalente) a 80 rpm \pm 5 rpm durante 1 hora. Lavar la placa 5 veces con el tampón de lavado. Transferir la placa sobre toallas de papel. Añadir 100 μ L/pocillo de sustrato K-Blue frío, cubrir con cinta selladora e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos (poner en marcha el temporizador en cuanto se añade el sustrato a la primera fila), con agitación a velocidad 3 sobre un agitador de placas Lab-Line Environ (o equivalente). Interrumpir la reacción añadiendo 100 μ L/pocillo de ácido fosfórico 2M (etapa 5.7). Colocar la placa sobre un agitador de placas a velocidad 3 durante 3-5 minutos. Tomar una lectura de la placa a 450 nm.

[0257] Análisis de datos y cálculo. NOTA: solo se aceptan muestras, aditivos, muestras enriquecidas y control con densidades ópticas dentro del límite de cuantificación práctica (estándar de 2,5 ng/m) de la curva estándar y que cumplan los criterios de CV% o de diferencia (%) que se indican más adelante. Si la OD de la muestra se encuentra por debajo de la de la solución estándar de 2,5 ng/mL, en el informe de los resultados se deberá indicar: menos de 2,5 ng/mL. Después, este valor se deberá dividir por la concentración de la muestra diluida (12 mg/mL) para indicar su valor en ng/mg. Si la muestra presenta una elevada concentración de células huésped que lleva a la muestra no enriquecida y/o la muestra enriquecida a superar la curva estándar, indicar el valor como > 100 ng/mL. Este valor se deberá dividir por la concentración de la muestra diluida (12 mg/mL) para indicar su valor en ng/mg. Considerar el valor de muestra cero para cálculos de recuperación de aditivo cuando la muestra está por debajo de la solución

estándar de 2,5 ng/mL.

[0258] Curva estándar. Se deberán introducir las concentraciones de las soluciones estándar en la plantilla del protocolo. Se emplea un ajuste de curva cuadrático. El coeficiente de determinación debe ser = 0,99 y el CV (%) entre pocillos triplicados debe ser = 20%. Si no se cumplen estos criterios: Se puede omitir un estándar (1 nivel, 3 pocillos). Si se omite el de 1,25 ng/mL, solo resultarán aceptables las muestras y muestras enriquecidas con densidades ópticas entre las densidades ópticas del de 2,5 ng/mL y el de 100 ng/mL (el resto de puntos de la curva estándar). Además, para los triplicados de cada nivel de estándar, si un único pocillo está claramente contaminado o presenta un bajo nivel de unión, se puede omitir. Si se omite un pocillo de un nivel de estándar las réplicas restantes deben tener una diferencia (%) = 20%. El CV (%) para el estándar más bajo, que presenta valores de OD próximos al fondo (blancos) de la placa, deberá ser = 30%. Si se omite un pocillo, la diferencia (%) para las restantes réplicas debe ser = 35%. Si se omite el estándar más bajo, solo resultarán aceptables las muestras y muestras enriquecidas con densidades ópticas entre las densidades ópticas del resto de la curva estándar.

[0259] Muestras. El CV (%) deberá ser = 20% entre los pocillos triplicados. Informar del CV (%) entre los pocillos triplicados. Se puede omitir un pocillo de cada dilución de la muestra. Las réplicas restantes deben tener una diferencia (%) = 20%. Nota: Si la OD de la muestra no enriquecida está por debajo de la OD del estándar de 2,5 ng/mL, no se aplica el criterio de diferencia (%) a los resultados de la muestra no enriquecida. Ver el cálculo anterior.

[0260] Calcular la concentración real de células huésped en ng/mg a partir del valor promedio (ng/mL) del siguiente modo: Proteína de célula huésped CHO (ng/mg) = Promedio de «resultado de muestra no enriquecida (ng/mL)»_concentración de muestra diluida (12 mg/mL).

[0261] Aditivos. El CV (%) deberá ser = 20% entre los pocillos triplicados. Registrar el CV (%) entre los pocillos triplicados. Se puede omitir un pocillo del aditivo. Los puntos restantes deben tener una diferencia (%) = 20%. Ver el cálculo anterior. Indicar la concentración de células huésped en ng/mL. Este resultado se usará en los cálculos de recuperación de aditivo. La concentración resultante para el aditivo (ng/mL) debe ser $\pm 20\%$ de la concentración teórica de aditivo. Registrar el resultado e indicar si se ha aceptado o rechazado. Si el resultado del aditivo se diferencia del teórico más del 20%, el ensayo debe repetirse. Concentración promedio de aditivo (ng/mL) x 100 debe ser = $100\% \pm 20\%$ de 10 ng/mL.

[0262] Muestras enriquecidas. El CV (%) deberá ser = 20% entre los pocillos triplicados. Registrar el CV (%) entre los pocillos triplicados. Se puede omitir un pocillo de cada dilución de la muestra enriquecida. Las réplicas restantes deben tener una diferencia (%) = 20%. Ver el cálculo anterior. Informar del «resultado de la muestra enriquecida» para cada dilución en ng/mL. Registrar la diferencia (%) entre las diluciones duplicadas. La diferencia (%) entre las diluciones deberá ser = 25%. Estos resultados se utilizarán en los cálculos de recuperación de aditivo.

[0263] Calcular % de recuperación de aditivo para conjunto de diluciones mediante la siguiente fórmula: % de recuperación de aditivo = $\frac{\text{valor de muestra enriquecida} - \text{valor de muestra no enriquecida}}{\text{valor de aditivo}} \times 100$. NOTA: (1) Si el valor de OD de la muestra no enriquecida no supera al del estándar de 2,5 ng/mL, considerar el valor como cero en el cálculo del % de recuperación de aditivo. La recuperación de aditivo % debe ser 100% 50% (50% a 150%) para cada dilución de cada muestra. Registrar los resultados y si se ha aceptado o rechazado.

[0264] Control. El CV (%) deberá ser = 20% entre los pocillos triplicados. Registrar el resultado del CV (%). Se puede omitir un pocillo del control. Las réplicas restantes deben tener una diferencia (%) = 20%. Ver el cálculo anterior. Indicar la concentración de células huésped en el control en ng/mL. Calcular la concentración de células huésped en ng/mg del siguiente modo: proteína de célula huésped (ng/mg) = resultado en ng/mL de la proteína de célula huésped de control.

50 4. Determinación de la concentración de proteína A en composiciones de anticuerpo anti-IL-12

[0265] En este ELISA, las placas se recubren con anticuerpo de pollo anti-proteína A y se incuban. Se bloquean los sitios no específicos con caseína en PBS. Las placas se lavan en PBS 1X + Triton X-100 al 0,1% para eliminar el material no unido. Las soluciones estándar de la proteína A-cis y las muestras se diluyen en PBS 1X + Triton X-100 al 4,1% + caseína al 10%. Las soluciones se desnaturalizan calentándolas a $95^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$, separando la proteína A de la ABT-874. Después se añaden las soluciones a la placa y se incuban. El material no unido se arrastra lavando con PBS 1X + Triton X-100 al 0,1%. Se añade anticuerpo de pollo biotinilado anti-proteína A a la placa de microtitulación y se incuba. Se lava la placa para eliminar el material no unido y se añade un conjugado de neutravidina-peroxidasa.

[0266] La neutravidina se unirá al anticuerpo de pollo biotinilado anti-proteína A que se ha unido a los pocillos. Se vuelve a lavar la placa para eliminar la neutravidina no unida y se añade sustrato K-Blue (tetrametilbencidina (TMB)) a la placa. El sustrato se hidroliza mediante la neutravidina unida y aparece un color azul. La reacción se interrumpe con ácido fosfórico y el color cambia a amarillo. La intensidad del color amarillo en los pocillos es directamente proporcional a la concentración de proteína A presente en los pocillos.

[0267] Preparación de reactivos y soluciones. Los frascos de caseína se deben calentar hasta $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; someter a sonicación durante 2 minutos y dividir en fracciones alícuotas. Las alícuotas se almacenarán a una temperatura nominal de 4°C . Cuando se va a llevar a cabo el análisis, se debe poner el número de alícuotas necesarias a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. El sustrato y el tampón de recubrimiento se deben usar fríos (apartarlos de la temperatura nominal de 4°C justo antes de usarlos).

[0268] Bicarbonato sódico 50 mM (tampón de recubrimiento), pH 9,4. En un vaso de precipitados de 1 L se añaden: 900 mL de agua Milli-Q; $4,20\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ de bicarbonato sódico. Agitar hasta su total disolución. Ajustar el pH a 9,4 con NaOH 1 N. Transferir a un matraz aforado de 1 L y enrasar con agua Milli-Q. Mezclar por inversión hasta lograr la homogeneidad. Filtrar a través de una unidad de filtro estéril de $0,22\text{ CA }\mu\text{m}$. Almacenar a una temperatura nominal de 4°C durante un periodo de hasta 7 días desde la fecha de preparación.

[0269] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,104 M, NaCl 1,3 M, KCl 0,027 M, KH_2PO_4 0,0176 M, pH = 6,8 – 6,9 (PBS 10X). Añadir aproximadamente 400 mL de agua Milli-Q a un vaso de precipitados de vidrio. Añadir $13,94\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Añadir $40,0\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ de NaCl. Añadir $1,00\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ de KCl. Añadir $1,20\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ de KH_2PO_4 . Agitar hasta lograr la homogeneidad. Transferir a un matraz aforado de 500 mL. Completar hasta un volumen de 500 mL con agua Milli-Q. Mezclar por inversión. Filtrar a través de una unidad de filtro estéril de $0,22\text{ CA }\mu\text{m}$. Almacenar a temperatura ambiente durante un periodo de hasta 7 días.

[0270] PBS 1X + Triton X-100 al 0,1%, pH 7,40: (tampón de lavado de placa). En un tubo graduado de 4 L, mezclar 400 mL de PBS 10 X (ver más arriba) con 3500 mL de agua Milli-Q. Comprobar el pH, y ajustar si fuera necesario hasta $7,40 \pm 0,05$ con HCl 1 N o NaOH 1 N. Enrasar con agua Milli-Q. Sellar bien el tubo con Parafilm y mezclar por inversión hasta lograr la homogeneidad. Transferir a un frasco de 4 L. Retirar 4 mL del PBS 1 X y desecharlos. Añadir 4 mL de Triton X-100 a los 3996 mL de PBS 1 X. Colocar en un agitador de placas y agitar hasta lograr su total disolución. Almacenar a temperatura ambiente durante un periodo de hasta 7 días.

[0271] Anticuerpo de pollo anti-proteína A de recubrimiento. Tomar una alícuota de anticuerpo por placa en el momento de su uso. Para cualificar nuevos lotes de anticuerpo de pollo anti-proteína A, puede ser necesario usar y cualificar el conjugado de anticuerpo de pollo anti-proteína A-biotina (preparado a partir del mismo lote del recubrimiento) juntos. Justo antes de su uso: Diluir la mezcla de anticuerpos en bicarbonato sódico 50 mM frío hasta lograr la concentración determinada durante la cualificación del recubrimiento. Por ejemplo: si durante la cualificación se determinó que la concentración del recubrimiento para cargar en la placa era de $6\text{ }\mu\text{g/mL}$ y si la concentración de la solución madre es de $3000\text{ }\mu\text{g/mL}$, entonces añadir 24 μL s de anticuerpo de recubrimiento a 11976 μL s de tampón de recubrimiento frío. Mezclar cuidadosamente mediante inversión.

[0272] Anticuerpo de pollo anti-proteína A biotinilado. Tomar una alícuota de anticuerpo por placa en el momento de su uso. Para cualificar nuevos lotes de conjugado de anticuerpo de pollo anti-proteína A-biotina, puede ser necesario usarlo y cualificarlo con el mismo lote de anticuerpo de pollo anti-proteína A a partir del cual se preparó. Justo antes de su uso: Diluir el anticuerpo biotinilado en caseína a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta lograr la concentración determinada durante la cualificación del anticuerpo biotinilado. Por ejemplo: si durante la cualificación se determinó que la concentración de anticuerpo biotinilado para cargar en la placa era de $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ y si la concentración de la solución madre es de $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$, entonces añadir 48 μL s de anticuerpo biotinilado a 11952 μL s de caseína a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Mezclar cuidadosamente mediante inversión.

[0273] Neutravidina-HRP. Reconstituir los nuevos lotes (2 mg/vial) hasta 1 mg/mL , del siguiente modo: Añadir 400 μL de agua Milli-Q al vial y después añadir 1600 μL de PBS 1X para un total de 2 mL. Agitar cuidadosamente en vórtex para mezclar. Almacenar a una temperatura nominal de -80°C . Preparar alícuotas con el volumen deseado, de manera que se use 1 alícuota por placa. Preparar en tubo de polipropileno. Asignar un periodo de validez de 6 meses tras la fecha de preparación. Por ejemplo, si se determina que la concentración de trabajo era de $0,1\text{ }\mu\text{g/mL}$, entonces se prepara de siguiente modo: Justo antes de su uso: descongelar una alícuota de neutravidina-HRP a temperatura ambiente. Diluir la solución de 1 mg/mL neutravidina hasta $0,01\text{ mg/mL}$ ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$) con caseína a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Por ejemplo: Diluir X10, añadir 50 μL de neutravidina a 450 μL de caseína. Agitar cuidadosamente en vórtex

para mezclar, X10 de nuevo, añadir 100 µg/mL de neutravidina X10 a 900 µL de caseína. a 37° C ± 2° C. Agitar cuidadosamente en vórtex para mezclar. Diluir aún más la solución de 10 µg/mL hasta 0,1 µg/mL con caseína a 37° C ± 2° C. Por ejemplo: Diluir X100, añadir 120 µL de neutravidina (10 µg/mL) a 11880 µL de caseína. Invertir varias veces cuidadosamente para mezclar.

5

[0274] Solución de interrupción (ácido fosfórico 1N comercial). Almacenar a temperatura ambiente durante un periodo de hasta 1 año desde la fecha de recepción. Tampón de dilución (PBS 1X + Triton X100 al 4,1% + caseína al 10%, pH 7,4). Añadir a un vaso de precipitados o matraz 86 mL de PBS 1X + Triton X100 al 0,1 %, pH 7,4 (de la etapa 5.3), añadir 4 mL de Triton X-100 y 10 mL de caseína bloqueante en PBS y agitar para disolver/mezclar.

10 Puede llevar de 20 a 30 minutos para disolver el Triton. Se obtiene una solución de PBS 1X + Triton X100 al 4,1% + caseína al 10%, con pH 7,4. Filtrar a través de una unidad de filtro estéril de 0,22 CA µm. Elaborar una preparación nueva para cada uso. Es suficiente para 1 placa.

[0275] Soluciones estándar de proteína A (soluciones estándar de antígeno). NOTA: Las soluciones madre se almacenan a una temperatura nominal de -20° C en alícuotas de 70 µL. Descongelar una alícuota sobre hielo. Llevar a cabo diluciones seriadas de acuerdo con los ejemplos en la siguiente tabla en tubos de polipropileno con el tampón de dilución (ver anterior etapa) utilizando la concentración que figura en el certificado de análisis (COA) del fabricante: Por ejemplo, si el COA indica que la concentración de la solución madre es 2,1 mg/mL (2100000 ng/mL), entonces: Descongelar las muestras sobre hielo. En tubos de microcentrífuga de propileno, diluir las muestras a granel finales hasta 20 mg/mL en el tampón de dilución (ver arriba). Llevar a cabo 2 diluciones distintas. Registrar la concentración. Usar las siguientes soluciones para preparar muestras enriquecidas y para preparar las soluciones de 10 mg/mL.

[0276] En tubos de microcentrífuga de polipropileno, diluir aún más las soluciones de 20 mg/mL hasta 10 mg/mL en tampón de dilución.

[0277] Preparación del aditivo. En un tubo de microcentrífuga de polipropileno, preparar un aditivo de proteína de célula huésped de 0,296 ng/mL a partir de la solución estándar de 0,593 mg/mL preparada anteriormente en la etapa 6.1 diluyéndola 2X con el tampón de dilución. Llevar a cabo una única dilución. Se cargarán en la placa los pocillos por triplicado para la solución de aditivo de 0,296 ng/mL. Usar la solución estándar de 0,593 ng/mL de la etapa 6.1 para enriquecer las muestras.

[0278] Preparación de muestras enriquecidas. En tubos de microcentrífuga de polipropileno, enriquecer 500 µL de cada una de las soluciones a granel finales de 20 mg/mL con 500 µL de la solución de aditivo de 0,593 ng/mL (6.1). Esperar hasta su desnaturalización. Se cargarán los pocillos por triplicado por cada una de las muestras enriquecidas, para un total de 6 pocillos.

[0279] Preparación del control. Obtener un lote del fármaco ABT-874. Preparar alícuotas de 150 µL y almacenarlas congeladas a una temperatura nominal de -80° C durante tres años desde la fecha en que tomaron las alícuotas.

40

[0280] Control de trabajo. Descongelar una alícuota del control sobre hielo. Diluir el control en un tubo de microcentrífuga de polipropileno hasta 10 mg/mL con el tampón de dilución hasta un volumen final de 1000 µLs. Preparar una única dilución. Esperar hasta su desnaturalización. Se cargarán en la placa los pocillos por triplicado con el control.

45

[0281] Desnaturalización. Para los blancos de la placa, añadir 1000 µLs de tampón de dilución a un número de tubos de microcentrífuga igual al de blancos que se van aplicar en la placa. Los tapones de los tubos se pueden sellar con Parafilm para impedir que se abran debido al calentamiento o se puede colocar una segunda bandeja encima para mantener los tapones cerrados. Calentar las soluciones estándar, muestras no enriquecidas, muestras enriquecidas, aditivo, blancos y control a 95° C ± 2° C durante 15 minutos. En caso de haberlo usado, retirar el Parafilm de los tubos durante el enfriamiento. Dejar enfriar durante 15 minutos y centrifugar durante 5 minutos a aproximadamente 10000 rpm. Transferir 700 µLs del sobrenadante a microtubos para cargarlos en la placa. Es preciso tener cuidado de no alterar el granulado de Triton/proteína.

[0282] Instrucciones del lavador de placas y configuración del baño de agua. Llenar el frasco de lavado de placa con el tampón de lavado de placa (ver etapa 5.3, PBS X1 + Triton X-100 al 0,1%). Cebiar el lavador de placas. Comprobar los siguientes parámetros: El ajuste de los parámetros debe ser: Tipo de placa: 1 para cada ciclo (un total de 4 ciclos): Velocidad de aspiración: 10 mm/s; Volumen: 400 µL; Tiempo de remojo: 5 segundos; tiempo de aspiración: 6 segundos. Encender el baño de agua y ajustarlo a 95° C. Permitir que la temperatura del baño se

55

equilibre a $95^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante al menos 30 minutos.

[0283] Procedimiento de análisis. Se puede usar una lista de comprobación como guía, tachando las etapas a medida que se van llevando a cabo. Además, registrar todo el equipo utilizado durante el análisis. La cantidad de 5 alícuotas de caseína que se van a usar para cada día del proceso de análisis se deben poner a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. El tampón de recubrimiento y el sustrato se usan fríos. Preparar soluciones de control, muestra, control, aditivo y muestras enriquecidas antes y durante la incubación de bloqueo. Puede llevar más tiempo que la 1 hora de incubación de bloqueo para preparar las diluciones, transferir a tubos Eppendorf, desnaturalizar durante 15 minutos, enfriar durante 15 minutos, centrifugar durante 15 minutos y transferir a microtubos. Dejar al menos 40 minutos antes 10 de bloquear las placas. Las muestras, muestras enriquecidas, soluciones estándar, control, aditivo de análisis, y blancos se cargan en la placa horizontalmente desde las filas B a la G mediante una pipeta de 12 canales. Las soluciones estándar se cargan desde una concentración alta a una baja. El recubrimiento de la placa, la adición de biotina, la adición de neutravidina, la adición de sustrato y la adición de solución de interrupción se llevan a cabo verticalmente desde la columna 2 a la 11.

15 **[0284]** Recubrir las placas con 100 μL /pocillo de anticuerpo de recubrimiento en bicarbonato sódico 50 mM frío. Golpear suavemente un lado de la placa hasta que la solución de recubrimiento cubra la parte inferior de los pocillos de manera uniforme, cubrir con cinta selladora e incubar a una temperatura nominal de 4°C con agitación en un agitador de placas (o equivalente) a velocidad 3.

20 **[0285]** Tras incubar toda la noche, retirar la placa del refrigerador y dejar que se equilibre hasta alcanzar la temperatura ambiente. Sacudir para retirar el recubrimiento. Transferir la placa sobre toallas de papel. Bloquear con 300 μL /pocillo de caseína a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, cubrir con cinta selladora e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación en un agitador de placas Lab-Line Environ (o equivalente) a 80 rpm \pm 5 rpm durante 1 hora \pm 10 minutos.

25 **[0286]** Preparar la solución estándar, la muestra, el control, el aditivo y las muestras enriquecidas antes y durante la incubación de bloqueo. Lavar la placa 4 veces con el tampón de lavado. Transferir la placa sobre toallas de papel. Con una pipeta de 8 canales, pipetear 100 μL /pocillo de soluciones estándar, muestras, aditivos, muestras enriquecidas y el control desnaturalizados por triplicado en pocillos de la placa. Los pocillos exteriores de la placa no 30 se usan, añadir a estos pocillos tampón de dilución no tratado. Cubrir con cinta selladora e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación sobre un agitador de placas Lab-Line Environ (o equivalente) a 80 rpm \pm 5 rpm durante 2 horas. Rellenar una plantilla para utilizarla como guía al cargar la placa.

35 **[0287]** Configuración del lector de placas. Lavar la placa 4 veces con el tampón de lavado. Transferir la placa sobre toallas de papel. Añadir 100 μL /pocillo de anticuerpo biotinilado. Cubrir con cinta selladora e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación en un agitador de placas Lab-Line Environ (o equivalente) a 80 rpm \pm 5 rpm durante 1 hora.

[0288] Lavar la placa 4 veces con el tampón de lavado. Transferir la placa sobre toallas de papel. Añadir 100 40 μL /pocillo de solución de conjugado de neutravidina-HRP. Cubrir con cinta selladora e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación en un agitador de placas Lab-Line Environ (o equivalente) a 80 rpm \pm 5 rpm durante 30 minutos. Lavar la placa 4 veces con el tampón de lavado. Transferir la placa sobre toallas de papel. Añadir 100 μL /pocillo de sustrato K-Blue frío, cubrir con cinta selladora e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos (poner en marcha el temporizador en cuanto se añada el sustrato a la primera fila), con agitación a velocidad 3 sobre un agitador de placas de titulación Lab-Line Environ (o equivalente). Interrumpir la reacción añadiendo 100 μL /pocillo de ácido 45 fosfórico 1N. Colocar la placa sobre un agitador de placas a velocidad 3 durante 3 minutos. Tomar una lectura de la placa a 450 nm.

[0289] Análisis de datos y cálculo. NOTA: Solo se aceptan muestras, aditivos, muestras enriquecidas y control con 50 densidades ópticas dentro del límite de cuantificación práctica de la curva estándar y que cumplan los criterios de CV% o de diferencia (%) que se indican más adelante. Si la OD de la muestra se encuentra por debajo de la curva estándar, en el informe de los resultados se deberá indicar: menos de 0,18 ng/mL (límite de cuantificación (LOQ) del análisis). Después, este valor se deberá dividir por la concentración de la muestra diluida (10 mg/mL) para indicar su valor en ng/mg. Si la muestra presenta una elevada concentración de proteína A que lleva a la muestra no enriquecida y/o la muestra enriquecida a superar la curva estándar (2 ng/mL), entonces diluir aún más para que 55 quede dentro de la curva estándar. Este valor se deberá dividir después por la concentración de la muestra diluida para indicar su valor en ng/mg. Para los cálculos de recuperación de aditivo, restar el valor de la muestra no enriquecida (ng/mL) del valor de la muestra enriquecida (ng/mL) incluso si el valor de la muestra no enriquecida (ng/mL) está por debajo de la curva. Si el valor es negativo o se obtiene un «intervalo», entonces considerar la muestra no enriquecida como cero para cálculos de recuperación de aditivo.

[0290] Curva estándar. Se deberán introducir las concentraciones de las soluciones estándar en la plantilla del protocolo. Se emplea un ajuste de curva cuadrático. El coeficiente de determinación debe ser = 0,99 y el CV (%) entre pocillos triplicados debe ser = 20%. Si no se cumplen estos criterios: Se puede omitir un estándar (1 nivel, 3 pocillos). Si se omite el de 0,18 ng/mL, solo resultarán aceptables las muestras y muestras enriquecidas con densidades ópticas entre las densidades ópticas del de 0,26 ng/mL y el de 2 ng/mL (el resto de puntos de la curva estándar). Además, para los triplicados de cada nivel de estándar, si un único pocillo está claramente contaminado o presenta un bajo nivel de unión, se puede omitir. Si se omite un pocillo de un nivel de estándar las réplicas restantes deben tener una diferencia (%) = 20%. El CV (%) para el estándar más bajo, que presenta valores de OD próximos al fondo (blancos) de la placa, deberá ser = 30%. Si se omite un pocillo, la diferencia (%) para las restantes réplicas debe ser = 35%. Si se omite el estándar más bajo, solo resultarán aceptables las muestras y muestras enriquecidas con densidades ópticas entre las densidades ópticas del resto de la curva estándar.

[0291] Calcular la diferencia (%) del siguiente modo: $\text{diferencia (\%)} = (\text{Abs. (resultado de dilución 1} - \text{resultado de dilución 2)/valor promedio}) \times 100\%$. El análisis se debe repetir si las soluciones estándar no cumplen los anteriores criterios. Informar de los valores de CV (%) y/o diferencia (%) y de los resultados del coeficiente de determinación de la curva estándar.

[0292] Muestras. El CV (%) deberá ser = 20% entre los pocillos triplicados. Informar del CV (%) entre los pocillos triplicados. Se puede omitir un pocillo de cada dilución de la muestra. Las réplicas restantes deben tener una diferencia (%) = 20%. Nota: Si la OD de la muestra no enriquecida está por debajo de la OD del estándar más bajo, no se aplica el criterio de diferencia (%) a los resultados de la muestra no enriquecida. Ver el cálculo anterior.

[0293] Informar del «resultado de la muestra no enriquecida» para cada dilución en ng/mL. Estos valores se usarán en los cálculos de la recuperación de aditivo. Calcular el promedio del «resultado de la muestra no enriquecida (ng/mL)» y la diferencia (%) entre diluciones. Informar de los resultados. La diferencia (%) entre diluciones debe ser = 25%. Calcular la concentración real de proteína A en ng/mg a partir del valor promedio (ng/mL) del siguiente modo: $\text{Proteína A (ng/mg)} = \text{Promedio de «resultado de muestra no enriquecida (ng/mL)»} \times \text{concentración de muestra diluida (10 mg/mL)}$. Registrar el resultado.

[0294] Aditivos. El CV (%) deberá ser = 20% entre los pocillos triplicados. Registrar el CV (%). Se puede omitir un pocillo del aditivo. Los puntos restantes deben tener una diferencia (%) = 20%. Ver el cálculo anterior. Indicar la concentración de proteína A en ng/mL. Este resultado se usará en los cálculos de recuperación de aditivo. La concentración resultante para el aditivo (ng/mL) debe ser $\pm 20\%$ de la concentración teórica de aditivo. Registrar el resultado e indicar si se ha aceptado o rechazado. Si el resultado del aditivo se diferencia del teórico más del 20%, el ensayo debe repetirse. $\text{Concentración promedio de aditivo (ng/mL)} \times 100$ debe ser = $100\% \pm 20\%$ de 0,296 ng/mL.

[0295] Muestras enriquecidas. El CV (%) deberá ser = 20% entre los pocillos triplicados. Registrar el CV (%) entre los pocillos triplicados. Se puede omitir un pocillo de cada dilución de la muestra enriquecida. Las réplicas restantes deben tener una diferencia (%) = 20%. Ver el cálculo anterior. Informar del «resultado de la muestra enriquecida» para cada dilución en ng/mL. Registrar la diferencia (%) entre las diluciones duplicadas. La diferencia (%) entre las diluciones deberá ser = 25%. Estos resultados se utilizarán en los cálculos de recuperación de aditivo. Calcular el % de recuperación de aditivo para cada conjunto de diluciones mediante la siguiente fórmula: $\% \text{ de recuperación de aditivo} = \frac{\text{valor de muestra enriquecida} - \text{valor de muestra no enriquecida}}{\text{valor de aditivo}} \times 100$. NOTA: Para los cálculos de recuperación de aditivo, restar el valor de la muestra no enriquecida (ng/mL) del valor de la muestra enriquecida (ng/mL) incluso si el valor de la muestra no enriquecida (ng/mL) está por debajo de la curva. Si el valor es negativo o se obtiene un «intervalo», entonces considerar la muestra no enriquecida como cero para cálculos de recuperación de aditivo. El % de recuperación de aditivo debe ser 100% 50% (50% a 150%) para cada dilución de cada muestra. Registrar los resultados y si se ha aceptado o rechazado.

[0296] Control. El CV (%) deberá ser = 20% entre los pocillos triplicados. Registrar el resultado del CV (%). Se puede omitir un pocillo del control. Las réplicas restantes deben tener una diferencia (%) = 20%.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir un anticuerpo, o porción del mismo de unión al antígeno, con un nivel reducido de proteína de célula huésped (HCP) a partir de una mezcla de muestra que comprende un anticuerpo, o parte del mismo de unión al antígeno, y al menos una HCP, y dicho procedimiento comprende:
- (a) sometimiento de dicha mezcla de muestra a una reducción del pH, con lo que se forma una muestra de recuperación primaria en la que el pH de dicha mezcla de muestra se reduce hasta un pH de 3 a 4 para formar dicha muestra de recuperación primaria;
- (b) ajuste de dicha muestra de recuperación primaria hasta un pH de 6,8 a 8, seguido de;
- (c) puesta en contacto de dicha muestra de recuperación primaria con una resina cromatográfica de afinidad de proteína A, lavado de dicha resina cromatográfica de afinidad con un tampón seleccionado entre el grupo formado por: 1) un tampón que comprende NaCl 0,5 M, acetato sódico 25 mM, a pH 5; 2) un tampón que comprende NaCl 0,5 M, acetato sódico 25 mM, a pH 5,5; y 3) un tampón que comprende NaCl 0,5 M, ácido cítrico/citrato sódico 20 mM, a pH 6, y recolección de una muestra de cromatografía de afinidad;
- (d) puesta en contacto de dicha muestra de cromatografía de afinidad con una resina de intercambio iónico y recolección de una muestra de intercambio iónico;
- (e) puesta en contacto de dicha muestra de intercambio iónico con una resina de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y recolección de una muestra de HIC, en la que dicha muestra de HIC comprende dicha preparación de anticuerpo, o porción del mismo de unión al antígeno, con un nivel reducido de HCP.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha reducción de pH se logra mezclando un ácido adecuado con dicha mezcla de muestra, y en el que dicho ácido adecuado se selecciona entre el grupo formado por ácido cítrico, ácido acético y ácido caprílico.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha resina de intercambio iónico es una resina de intercambio catiónico.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha resina de intercambio iónico es una resina de intercambio aniónico.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha resina de HIC comprende una matriz sustituida, en la que los sustituyentes consisten en uno o más grupos hidrófobos.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende una etapa de filtración, en la que dicha muestra de HIC se somete a filtración para eliminar partículas víricas y para facilitar el intercambio de tampones.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha preparación de anticuerpo, o porción del mismo de unión al antígeno, con nivel reducido de HCP comprende o un anticuerpo anti-IL-12, o una porción del mismo de unión al antígeno, o bien un anticuerpo anti-TNF α , o una porción del mismo de unión al antígeno.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho anticuerpo anti-IL-12, o porción del mismo de unión al antígeno, es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo híbrido o un anticuerpo multivalente.
9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho anticuerpo anti-TNF α , o porción del mismo de unión al antígeno, es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo híbrido o un anticuerpo multivalente.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha preparación está sustancialmente exenta de HCP.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende una filtración en profundidad.

• **Secuencia de región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-18 (ABT-325)**

1 10 20 30 40 50
EVQLVQSGTE VKKPGESLKI SCKGSGYTVT SYWIGWVRQM PGKGLEWMGF

IYPGDSETRY SPTFQGQVTI SADKSFNTAF LQWSSLKASD TAMYYCARVG

SGWYPYTFDI WGQGTMTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV

KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TWPSSSLGTQ

TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKS

• **Secuencia de región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-IL-18 (ABT-325)**

1 10 20 30 40 50
EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASESIS SNLAWYQQKP GQAPRLFIYT

ASTRATDIPA RFGSGSGGTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ YNNWPSITFG

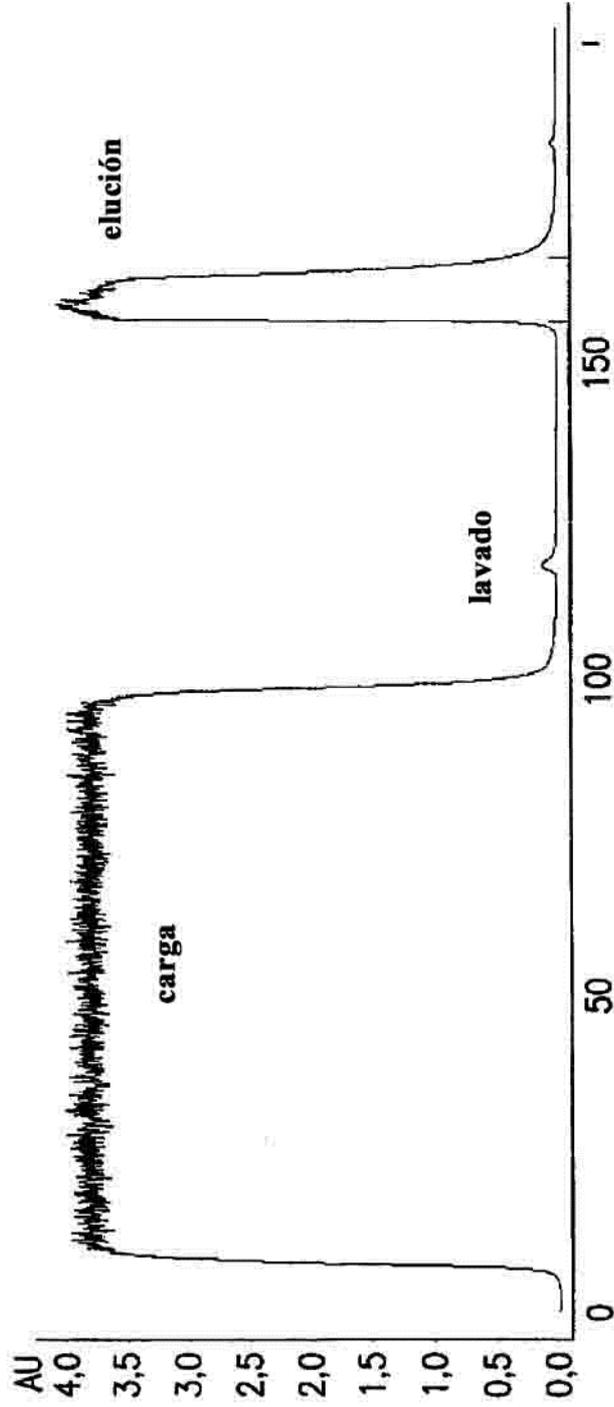
QGTRLEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK

VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KUYACEVTHQ

GLSSPVTKSF NRGE

FIG.2

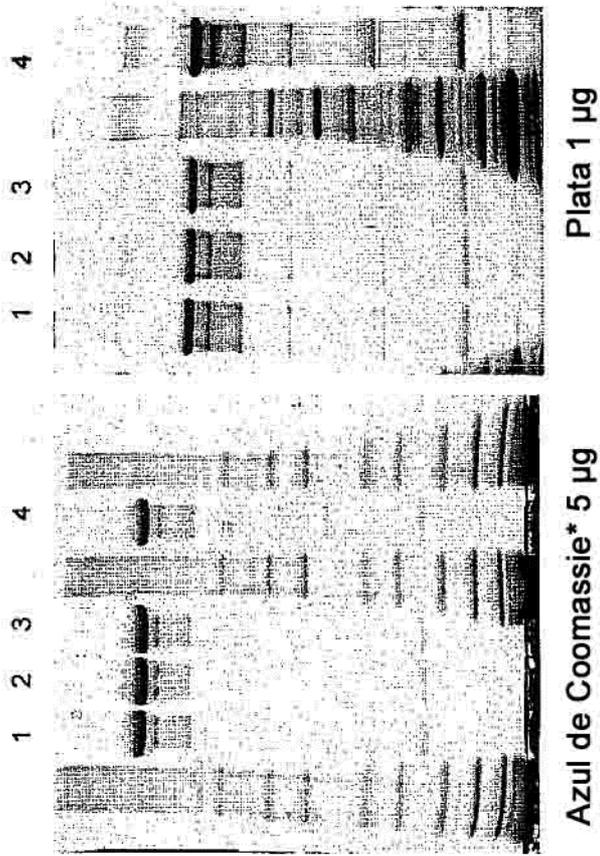
Cromatograma de columna MabSelect™ a escala de biorreactor de 300 L



Datos presentados como absorbancia (280 nm) frente a volumen de elución.

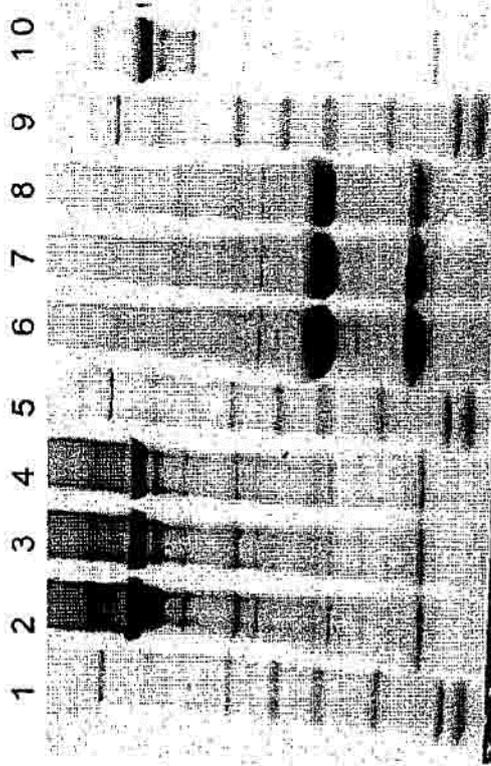
FIG.4

Evaluación de las condiciones de lavado de MabSelect™



Los carriles 1, 2 y 3 correspondían a AB eluido sin lavado, con lavado de NaCl 0,5 M o citrato 20 mM, lavado de NaCl 0,5 M a pH, respectivamente. El carril 4 se lavó con tampón de citrato 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 6.

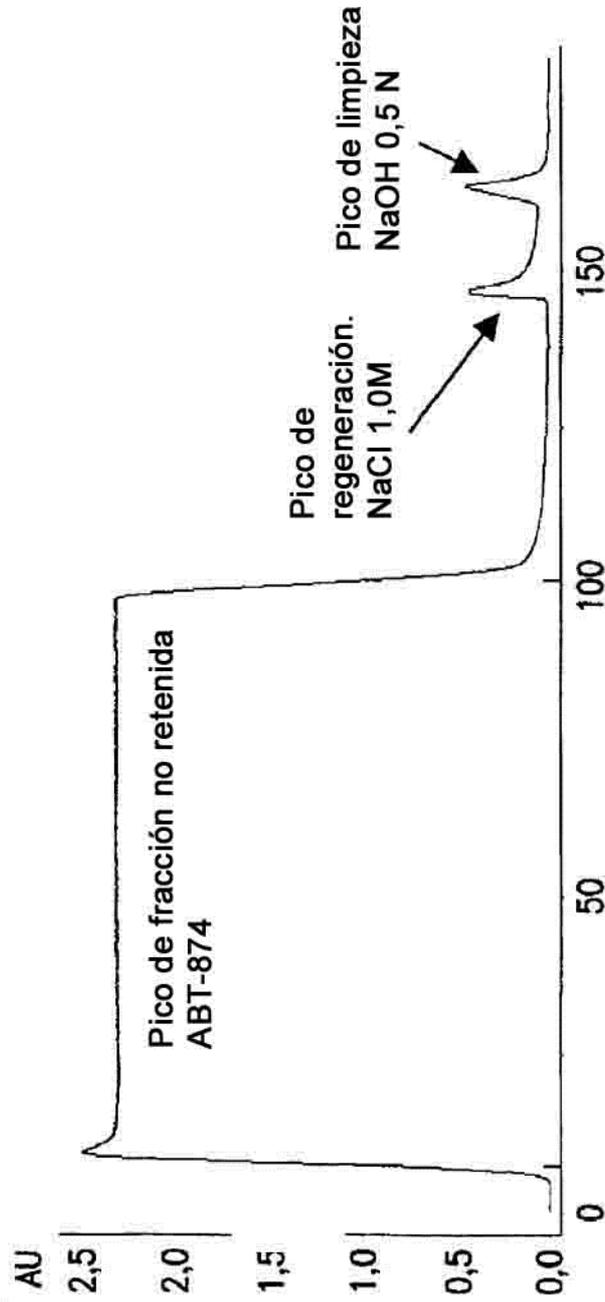
FIG.5

SDS-PAGE de precipitados a 7 mS/cm y pH 8

Los carriles 1, 5 y 9 corresponden a un peso molecular estándar. Los carriles 2, 3 y 4 corresponden a los precipitados formados a pH 8 y 7 mS/cm (no reducidos). Los carriles 6, 7 y 8 corresponden a los precipitados formados a pH 8 y 7 mS/cm (reducidos). El carril 10 corresponde al eluido de MabSelect™.

FIG.6

Perfil de lavado de la fracción no retenida por la columna cromatográfica de Q Sepharose™ FF a escala de biorreactor de 300 L



Datos presentados como absorbancia (280 nm) frente a volumen del proceso.

FIG.7

Perfil de elución de la columna cromatográfica de Phenyl Sepharose™ HP a escala de biorreactor de 300 L

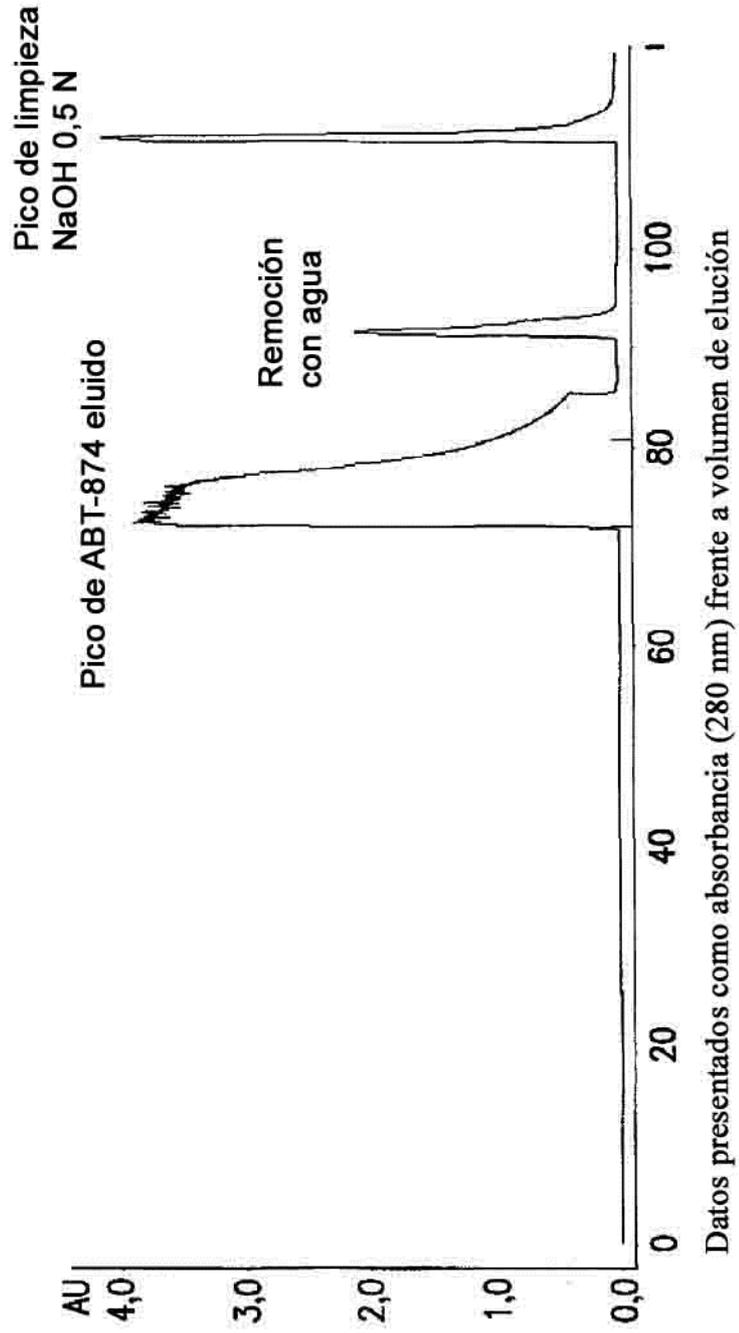
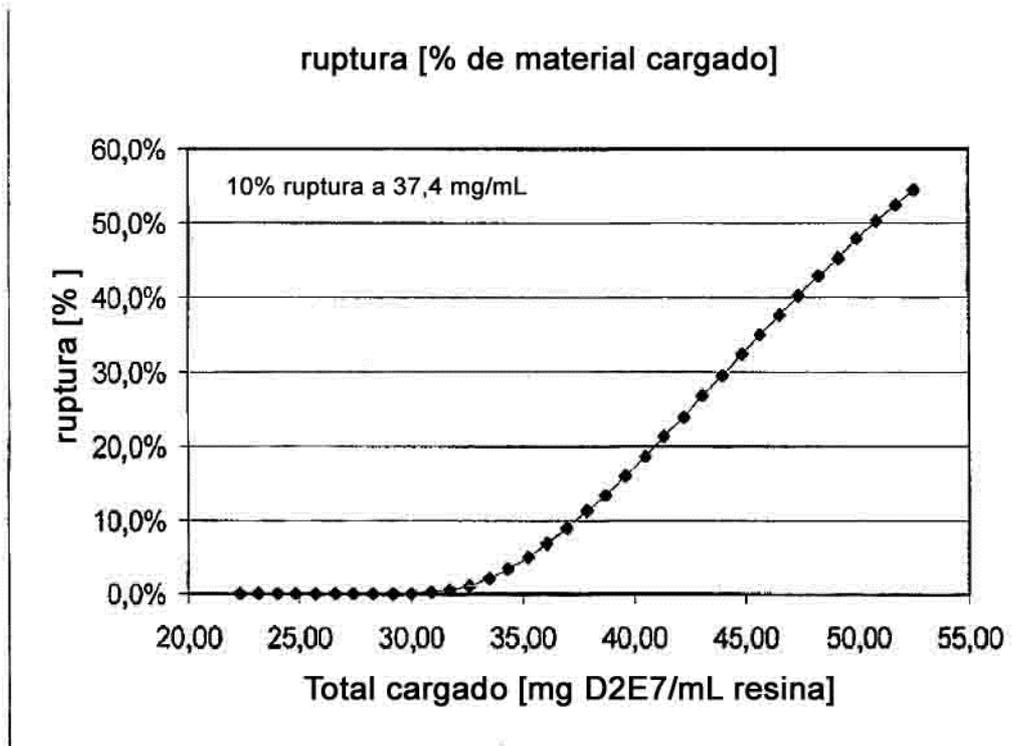


FIG.8

Curva de ruptura de unión de anticuerpo en MabSelect™



Material: cultivo de anticuerpo clarificado AY-04, lote 35205BI

Carga: pH 7, 400 cm/hora

Tamaño de columna: 1,6 x 5 cm

FIG.9

SDS-PAGE de tanda de proceso de proteína A, y AY-04

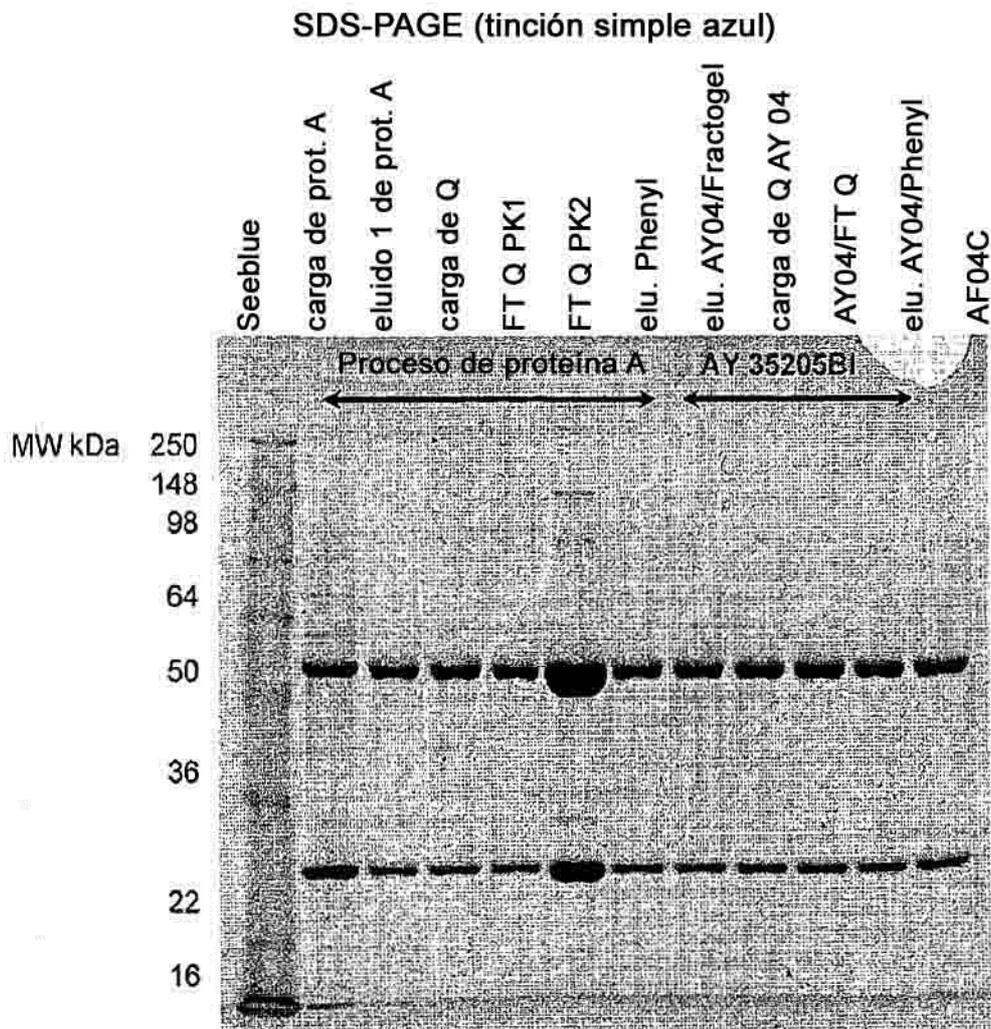
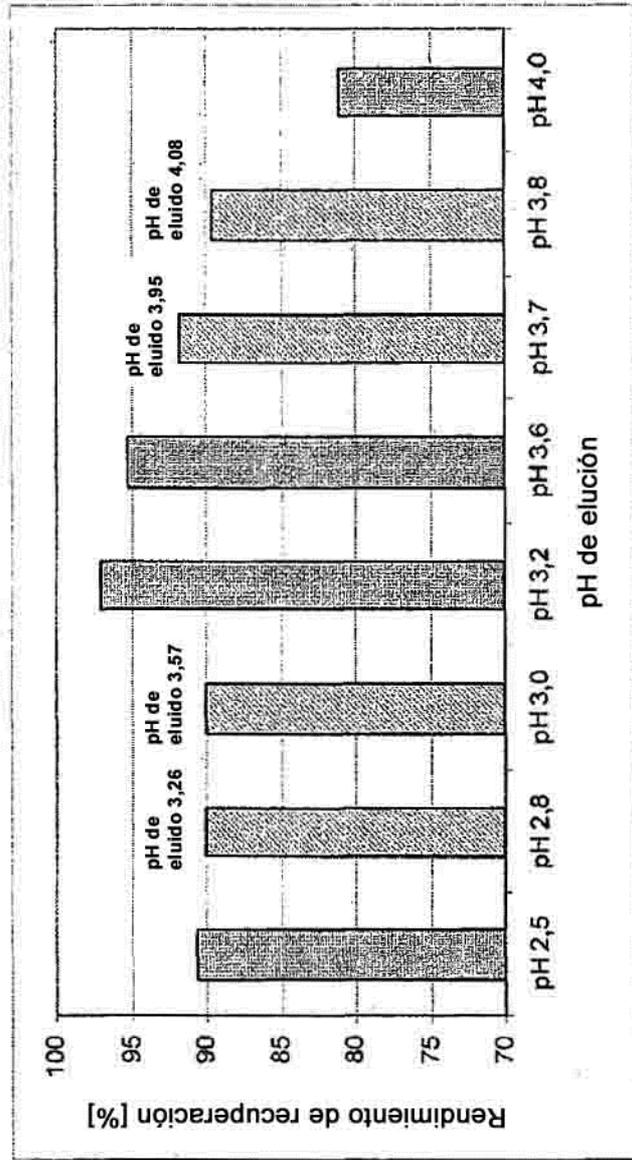


FIG.10

Rendimiento de recuperación de Adalimumab del MabSelect™ frente a pH de elución



Material: cultivo de anticuerpo clarificado AY-04, lote 35205BI

Carga: pH 7, 400 cm/hora

Tamaño de columna: 1,6 x 5 cm

FIG.11

Monómeros de Anticuerpo (o Adalimumab) frente a pH de elución y tiempo de incubación

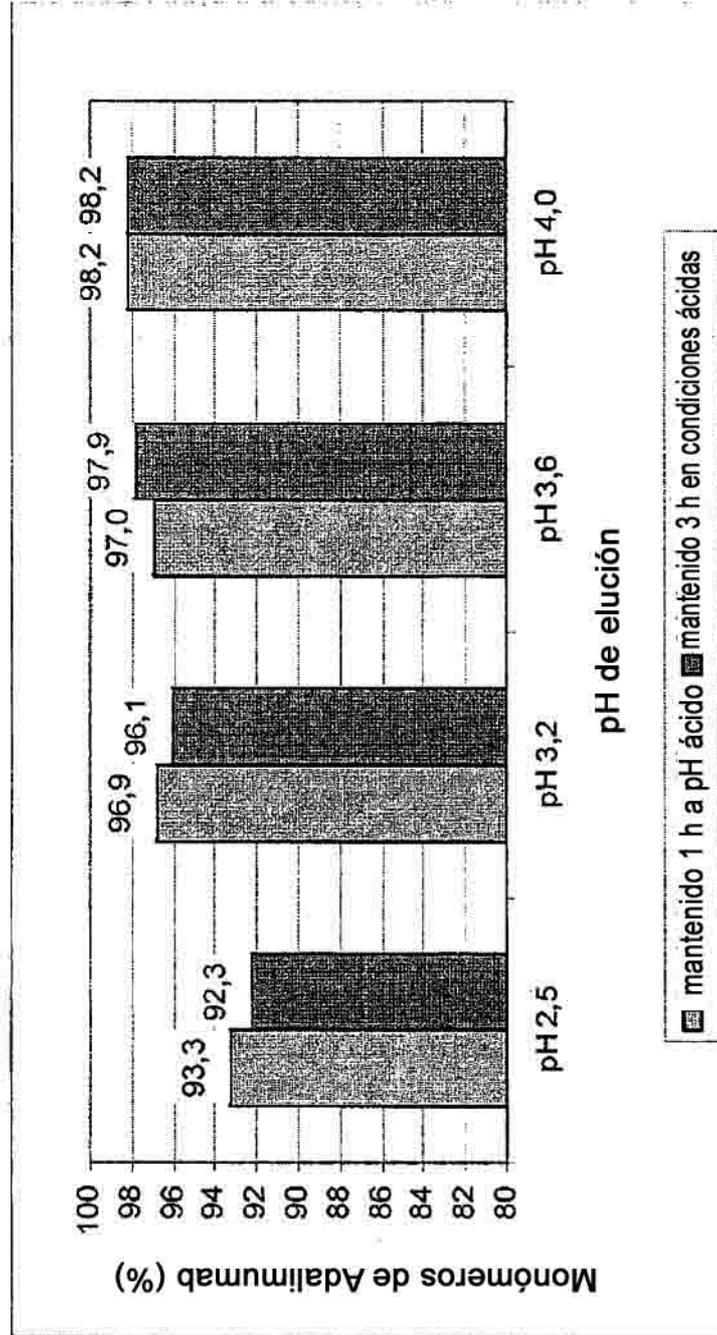


FIG.12