

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 440**

51 Int. Cl.:

A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2006** **PCT/GB2006/003650**
87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2007** **WO07036745**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2006** **E 06794604 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018** **EP 1942939**

54 Título: **Composición de anticuerpo contra interleuquina-13**

30 Prioridad:

30.09.2005 GB 0519923
30.09.2005 US 721974 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2018

73 Titular/es:

MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building Granta Park Cambridge
Cambridgeshire CB21 6GH, GB

72 Inventor/es:

FISH, BRENDAN, CORMICK;
LANGSTONE, JEANETTE, ELIZABETH;
BANNISTER, KAREN y
HOPE, CLAIRE, LOUISE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 685 440 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

Composición de anticuerpo contra interleuquina-13

5 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo contra interleuquina-13, más especialmente un anticuerpo monoclonal contra interleuquina-13, especialmente un anticuerpo monoclonal contra interleuquina-13 humano, a un proceso para purificar dicho anticuerpo y a dicha composición para su uso en el
10 tratamiento de trastornos relacionados con la interleuquina-13, tales como asma.

La interleuquina (IL)-13 es una citoquina de 114 aminoácidos con una masa molecular no modificada de aproximadamente 12 kDa. IL-13 está muy estrechamente relacionada con la IL-4, con la que comparte un 30 % de homología de secuencia en sus aminoácidos. El gen IL-13 humano está situado en el cromosoma 5q31 adyacente al
15 gen IL-4 [McKenzie, A.N. *et al.*, J Immunol, 1993. 150(12), 5436-5444; Minty, A. *et al.*, Nature, 1993. 362(6417), 248-50].

Aunque inicialmente se identificó como una citoquina derivada el linfocito Th2 CD4+, IL-13 también se produce en linfocitos T Th1+ CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos NK, y poblaciones no de linfocitos T tales como mastocitos,
20 basófilos, eosinófilos, macrófagos, monocitos y células de la musculatura lisa de las vías respiratorias.

IL-13 se ha vinculado a numerosas enfermedades, en particular, enfermedades que están causadas por una respuesta inflamatoria. Por ejemplo, la administración de IL-13 a las vías respiratorias de roedores no expuestos a
25 tratamiento no sensibilizados ha mostrado producir algunos aspectos del fenotipo del asma, incluida la inflamación de las vías respiratorias, producción de moco e hipersensibilidad de las vías respiratorias (HVR) [Wills-Karp, M. *et al.*, Science, 1998. 282(5397), 2258-2261; Grunig, G. *et al.*, Science, 1998. 282(5397), 2261-2263; Venkayya, R., *et al.*, Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. 26(2), 202-208; Morse, B. *et al.*, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. 282(1), L44-49]. Se observó un fenotipo similar en un ratón transgénico en el que IL-13 se expresaba en exceso de forma específica en el pulmón. En este modelo, una exposición más crónica a IL-13 también redujo la fibrosis [Zhu,
30 Z. *et al.*, J Clin Invest, 1999. 103(6), 779-788].

Numerosos polimorfismos genéticos del gen IL-13 también se han vinculado con enfermedades alérgicas. En particular, una variante del gen IL-13 en el que el resto arginina del amino ácido 130 se ha sustituido por glutamina (Q130R) se ha asociado con asma bronquial, dermatitis atópica y niveles séricos elevados de IgE [Heinzmann, A. *et al.*, Hum Mol Genet, 2000. 9(4), 549-559; Howard, T. D. *et al.*, Am J Hum Genet, 2002. 70(1), 230-236; Kauppi, P. *et al.*, Genomics, 2001. 77(1-2), 35-42; Graves, P. E. *et al.*, J Allergy Clin Immunol, 2000. 105(3), 506-513]. Esta variante de L-13 concreta también se denomina variante Q110R (el resto arginina del aminoácido 110 está sustituido por glutamina) por algunos grupos que excluyen la secuencia señal de 20 aminoácidos del recuento de aminoácidos.

La producción de IL-13 también se ha asociado con el asma alérgica [van der Pouw Kraan, T. C. *et al.*, Genes Immun, 1999. 1(1), 61-65] y se han medido niveles aumentados de IL-13 en sujetos humanos con rinitis atópica (fiebre del heno), dermatitis alérgica (eczema) y sinusitis crónica.

Además del asma, IL-13 se ha asociado con otras dolencias fibróticas. Niveles aumentados de IL-13, hasta 1000
45 veces mayores de los de IL-4, se han medido en el suero de pacientes con esclerosis sistémica y en muestras de lavado broncoalveolar (BAL) procedente de pacientes afectados con otras formas de fibrosis pulmonar [Hasegawa, M. *et al.*, J Rheumatol, 1997. 24(2), 328-332; Hancock, A. *et al.*, Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. 18(1), 60-65].

Se ha demostrado que la expresión en exceso de IL-13 en el pulmón de ratones produce enfisema, producción elevada de moco e inflamación, lo que refleja aspectos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) humana [Zheng, T. *et al.*, J Clin Invest, 2000. 106(9), 1081-1093].

Se ha propuesto que IL-13 puede también tener un papel en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria del intestino [Heller, F. *et al.*, Immunity, 2002. 17(5), 629-38] y se han detectado niveles aumentados de IL-13 en el
55 suero de algunos pacientes con enfermedad de Hodgkin en comparación con los controles normales [Fiumara, P. *et al.*, Blood, 2001. 98(9), 2877-2878].

También se cree que los inhibidores de IL-13 son terapéuticamente útiles en la prevención de la recurrencia o metástasis tumoral [Terabe, M. *et al.*, Nat Immunol, 2000. 1(6), 515-520]. También se ha mostrado que la inhibición
60 de IL-13 potencia las vacunas antivíricas en modelos animales, y podría ser beneficiosa para el tratamiento del VIH y otras enfermedades infecciosas [Ahlers, J. D. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2002. 99(20), 13020-13025].

Se ha descrito un enfoque de anticuerpo dirigido contra la inhibición de IL-13. Por ejemplo, el documento WO 2005/007699 (Cambridge Antibody Technology Limited) describe una serie de moléculas de anticuerpos humanos
65 contra IL-13 que han demostrado neutralizar la actividad de IL-13, y cuyo uso potencial se reivindica para el tratamiento de trastornos relacionados con IL-13.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo contra IL-13, acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 85 mM y polisorbato 80 al 0,01 % tamponado a un pH de 4,5 a 6,0.

5 Se sabe normalmente que los procedimientos de purificación de anticuerpos suelen necesitar numerosas técnicas de separación, tales como separaciones cromatográficas (por ejemplo, cromatografía de Proteína A, cromatografía de intercambio iónico). Una consecuencia de este tipo de separación es que se necesita el uso de varios tampones diferentes. Por ejemplo, el procedimiento de purificación de anticuerpos descrito en el documento WO 2004/076485 requiere el uso de glicina/glicinato 50 mM pH 8,0 para la cromatografía de Proteína A, TrisHCl 50 mM pH 8,0 y
10 fosfato de sodio 20 mM pH 6,5, para cromatografía de Q-Sepharose, y TrisHCl 25 mM pH 8,6 para cromatografía de DEAE-sefaroza.

Por el contrario, la presente invención requiere el uso de un único tampón acetato a una concentración fija y un pH predeterminado presente en la composición de la invención, que tiene la ventaja de estar presente durante la
15 totalidad de todas las etapas de purificación de anticuerpos contra IL-13. Por tanto, el uso de este tampón, no solamente al principio del proceso de purificación, sino en la totalidad del proceso de purificación completo, por tanto, da como resultado una reducción del tiempo de procesamiento, costes, y un aumento en el rendimiento de producto.

20 Se apreciará que las referencias a "anticuerpo" incluyen las referencias a una inmunoglobulina, tanto de origen natural, como producida total o parcialmente de forma sintética. El término también incluye cualquier polipéptido o proteína que comprenda un dominio de unión a antígeno.

Los fragmentos de anticuerpos que comprenden un dominio de unión a antígeno son moléculas tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos.
25

Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conserven la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifica la región variable de la inmunoglobulina, o las
30 regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo en las regiones constantes, o en las regiones constantes y las regiones marco, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB2188638A o EP-A-239400, y una gran cantidad de bibliografía posterior.

Como alternativa, se pueden generar regiones VH o VL novedosas que incluyan secuencias derivadas de CDR usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro del dominio variable completo. Dicha técnica se describe por Gram *et al.*, PNAS EE.UU., 1992. 89, 3576-3580, que utiliza PCR propensa a error. Otro método que se puede utilizar es dirigir la mutagénesis a las regiones CDR de los genes de VH y VL. Dichas técnicas se han descrito en Barbas *et al.*, PNAS USA 1994. 91, 3809-3813 y Schier *et al.*, J. Mol. Biol. 1996. 263, 551-567.
40

Como los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras, el término "anticuerpo" debería tomarse para abarcar cualquier ligando o sustancia específicos que tenga un dominio de unión a antígeno con la especificidad necesaria. Por tanto, este término abarca fragmentos de anticuerpos y derivados, que incluyen cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto, se
45 incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023, y una gran cantidad de bibliografía posterior.

Otras técnicas disponibles en la técnica de diseño de anticuerpos mediante ingeniería genética han posibilitado aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, se pueden fabricar hibridomas humanos como se describe en Kontermann *et al.*, [2001; Antibody Engineering, Springer Laboratory Manuals]. La expresión en fagos, otra técnica establecida para generar ligandos específicos, se ha descrito detalladamente en muchas publicaciones, tal como la de Kontermann *et al.* (más arriba) y el documento WO92/01047. Los ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpos de ratón se han inactivado y sustituido funcionalmente con genes de anticuerpos humanos, dejando intactos otros componentes del sistema inmunitario del ratón, se pueden usar para aislar anticuerpos humanos contra antígenos humanos. La expresión en ribosomas, una tecnología de traducción que no requiere células, que introduce mutaciones en secuencias génicas conocidas, también se puede utilizar para generar y/u optimizar ligandos específicos [Hanes y Plückthun PNAS USA, 1994. 94, 4937-4942; He y Taussig Nucleic Acids Res. 1997. 25, 5132-5134; Schaffitzel *et al.*, J. Immunol. Methods, 1999. 231, 119-135; He *et al.*, J. Immunol. Methods, 1999. 231, 105-117; He *et al.*, Methods Mol. Biol. 2004. 248, 177-189].
60

Se pueden crear moléculas de anticuerpos sintéticos mediante su expresión a partir de genes generados mediante oligonucleótidos sintetizados y ensamblados dentro de vectores de expresión adecuados, por ejemplo, como se describe en Knappik *et al.*, J. Mol. Biol. 2000. 296, 57-86 o Krebs *et al.*, Journal of Immunological Methods 2001. 254, 67-84.
65

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en dominios VL, VP, CL y CP1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VP y CP1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VP de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb [Ward, E. S. *et al.*, Nature, 1989. 341, 544-546; McCafferty *et al.*, Nature, 1990. 348, 552-554; Holt *et al.*, Trends Biotechnol. 2003. 21(11), 484-490] que consiste en un dominio VH o VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno [Bird *et al.*, Science, 1988. 242, 423-426; Huston *et al.*, PNAS EE.UU., 1988. 85, 5879-5883]; (viii) dímeros Fv monocatenarios biespecíficos (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos por fusión génica (documento WO94/13804; P. Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993. 90, 6444-6448]. Las moléculas de Fv, scFv o diacuerpos se pueden estabilizar mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL [Y. Reiter *et al.*, Nature Biotech., 1996. 14, 1239-1245]. También se pueden preparar minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 [S. Hu *et al.*, Cancer Res., 1996. 56, 3055-3061].

Cuando se van a usar anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que se pueden fabricar de diversas maneras [Holliger y Winter Current Opinion Biotechnol. 1993. 4, 446-449], por ejemplo, preparadas químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente. Ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen aquellos de tecnología BiTE en la que los dominios de unión de dos anticuerpos con especificidad diferentes se pueden utilizar y unirse directamente mediante péptidos cortos flexibles. Esto combina dos anticuerpos en una cadena corta de un único polipéptido. Los diacuerpos y scFv pueden construirse sin una región Fc, usando solamente dominios variables, lo que reduce potencialmente los efectos de reacción antiidiotípica.

Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos biespecíficos completos, también pueden ser particularmente útiles porque pueden construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión adecuadas se pueden seleccionar fácilmente usando la expresión en fagos (documento WO94/13804) a partir de bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo debe mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra IL-13, entonces se puede fabricar una biblioteca en la que se varíe el otro brazo y se seleccione un anticuerpo de especificidad adecuada. Los anticuerpos biespecíficos completos pueden prepararse mediante el diseño genético denominado *pomo en agujero* [Ridgeway *et al.*, Protein Eng., 1996. 9, 616-621].

Se apreciará que las referencias a "un anticuerpo contra IL-13" incluye referencias a un anticuerpo completo o fragmento de anticuerpo que es capaz de neutralizar la IL-13 que se produce de forma natural a una concentración de menos de 500 nM siguiendo los ensayos que se definen en los Ejemplos 2-10 y 25 del documento WO 2005/007699.

Preferentemente, el anticuerpo contra IL-13 neutraliza la IL-13 que se produce de forma natural con una potencia que es igual a o mejor que la potencia de un sitio de unión a un antígeno de IL-13 formado por el dominio VH de BAK502G9 (SEQ ID NO:15 del documento WO 2005/007699) y el dominio VL de BAK502G9 (SEQ ID NO:16 del documento WO 2005/007699).

Preferentemente, el anticuerpo contra IL-13 es un anticuerpo monoclonal contra IL-13, más preferentemente un anticuerpo monoclonal humano contra IL-13.

Un anticuerpo contra IL-13 particularmente preferido es uno seleccionado entre los descritos en los documentos WO 2003/035847, WO 2003/086451, WO 2005/007699 o WO 2005/081873.

Por ejemplo, en una realización particularmente preferida, el anticuerpo contra IL-13 es BAK278D6 HCDR1-3 y LCDR1-3 (SEQ ID NOS: 1-6 del documento WO 2005/007699, respectivamente). Un conjunto de CDR con el conjunto BAK278D6 de CDR, el conjunto BAK278D6 de HCDR o BAK278D6 de LCDR, o una o dos sustituciones en las anteriores, se dice que es del linaje BAK278D6.

En una realización adicional particularmente preferida, el anticuerpo contra IL-13 es BAK502G9 HCDR1-3 y LCDR1-3 (SEQ ID NOS: 7-12 del documento WO 2005/007699, respectivamente).

En otra reacción adicional particularmente preferida, el anticuerpo contra IL-13 es BAK1111D10 HCDR1-3 y LCDR1-3 (SEQ ID NOS: 91-96 del documento WO 2005/007699, respectivamente).

En otra reacción adicional particularmente preferida, el anticuerpo contra IL-13 es BAK1167F2 HCDR1-3 y LCDR1-3 (SEQ ID NOS: 61-66 del documento WO 2005/007699, respectivamente).

En otra reacción adicional particularmente preferida, el anticuerpo contra IL-13 es BAK1183H4 HCDR1-3 y LCDR1-3 (SEQ ID NOS: 97-102 del documento WO 2005/007699, respectivamente).

El conjunto relevante de CDR se proporciona dentro de las regiones marco de anticuerpos u otras proteínas estructurales, por ejemplo, fibronectina o citocromo B [Koide *et al.*, J. Mol. Biol. 1998. 284, 1141-1151; Nygren *et al.*, Current Opinion in Structural Biology, 1997. 7, 463-469]. Se emplean preferentemente regiones marco del anticuerpo y, cuando se emplean, son preferentemente líneas germinales, más preferentemente, la región marco del anticuerpo para la cadena pesada puede ser DP14 procedente de la familia VH1. La región marco preferida para la cadena ligera puede ser λ 3-3H. Para el conjunto BAK502G9 de las CDR se prefiere que las regiones marco del anticuerpo sean, para FR1-3 de VH, las SEQ ID NOS: 27-29 del documento WO 2005/007699, respectivamente y para la cadena ligera FR1-3, las SEQ ID NOS: 30-32 del documento WO 2005/007699, respectivamente. En una realización preferida, se proporciona un dominio VH con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 del documento WO 2005/007699, denominándose este como el "dominio VH de BAK502G9". En una realización adicional muy preferida, se proporciona un dominio VL con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 del documento WO 2005/007699, denominándose este como el "dominio VL de BAK502G9".

En una realización preferida, el anticuerpo contra IL-13 reacciona en cruzado con IL-13 de macaco cinomolgo y/o la variante de IL-13, Q130R.

Preferentemente, el anticuerpo contra IL-13 está presente en la composición farmacéutica en una cantidad comprendida entre 1 y 200 mg/ml, más preferentemente, 50 y 100 mg/ml, especialmente 50 mg/ml. La composición farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo contra IL-13, acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 85 mM y polisorbato 80 al 0,01 % tamponado a un pH de 4,5 a 6,0. Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden tamponarse a un pH de 5,2 a 5,7, lo más preferente $5,5 \pm 0,1$. La selección de dicho pH confiere una estabilidad significativa a la composición farmacéutica. Ejemplos de tampones alternativos que controlan el pH en este intervalo incluyen succinato, gluconato, histidina, citrato, fosfato, glutámico, cacodilato, hidrógeno maleato de sodio, tris-(hidroximetil)aminometano (Tris), ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico (MES), imidazol y otros tampones ácidos orgánicos.

Un tampón puede ser un tampón acetato, más preferentemente acetato de sodio. El tampón acetato de las composiciones divulgadas en el presente documento puede estar presente en la composición farmacéutica en una cantidad de entre 1 y 100 mM, más preferentemente 30 y 70 mM, especialmente 50 mM.

Se apreciará que las referencias a un "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluyen referencias a cualquier excipiente utilizado convencionalmente en las composiciones farmacéuticas. Dichos excipientes pueden incluir normalmente uno o más tensioactivos, sales inorgánicas u orgánicas, estabilizantes, diluyentes, solubilizantes, agentes reductores, antioxidantes, agentes quelantes, conservantes.

Ejemplos de un tensioactivo típico incluyen: tensioactivos no iónicos (HLB 6 a 18) tales como ésteres de ácidos grasos de sorbitán (por ejemplo, monocaprilato de sorbitán, monolaurato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán), ésteres de ácidos grasos de glicerina (por ejemplo, monocaprilato de glicerina, monomiristato de glicerina, monoestearato de glicerina), ésteres de ácidos grasos de poliglicerina (por ejemplo, monoestearato de decaglicerilo, diestearato de decaglicerilo, monolinoleato de decaglicerilo), ésteres de ácidos grasos de sorbitán (por ejemplo monolaurato de sorbitán polioxietilenado, monooleato de sorbitán polioxietilenado, monoestearato de sorbitán polioxietilenado, monopalmitato de sorbitán polioxietilenado, trioleato de sorbitán polioxietilenado, tristearato de sorbitán polioxietilenado, ésteres de ácidos grasos de sorbitol polioxietilenado (por ejemplo, tetraestearato de sorbitol polioxietilenado, tetraoleato de sorbitol polioxietilenado), ésteres de ácidos grasos de glicerina polioxietilenada (por ejemplo, monoestearato de glicerilo polioxietilenado), ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol (por ejemplo, diestearato de polietilenglicol), éteres de alquilo polioxietilenado (por ejemplo, éter de laurilo polioxietilenado), éteres de alquilo polioxietilenado polioxipropilenado (por ejemplo, éter de propilenglicol polioxietilenado polioxipropilenado, éter de propilo polioxietilenado polioxipropilenado, éter de acetilo propilo polioxietilenado polioxipropilenado), ésteres de alquilfenilo polioxietilenado (por ejemplo, éter de nonilfenilo polioxietilenado), aceites de ricino hidrogenados polioxietilenados (por ejemplo, aceite de ricino propilo polioxietilenado, aceite de ricino polioxietilenado hidrogenado), derivados de cera de abeja polioxietilenados (cera de abejas de sorbitol polioxietilenado), derivados de lanolina polioxietilenada (por ejemplo, lanolina polioxietilenada), y amidas de ácidos grasos polioxietilenadas (por ejemplo, amida de estearilo polioxietilenado); tensioactivos aniónicos tales como sales de sulfatos de alquilo C_{10} - C_{18} (por ejemplo, cetilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, oleilsulfato de sodio, sales de alquil C_{10} - C_{18} éter sulfatos polioxietilenados con un promedio de 2 a 4 moles de óxido de etileno (por ejemplo, laurilsulfato de sodio polioxietilenado), y sales alquil C_8 - C_{18} éster sulfosuccinato (por ejemplo lauriléster sulfosuccinato de sodio); y tensioactivos naturales tales como lecitina, glicerofosfolípidos, esfingofosfolípidos (por ejemplo, esfingomielina), y ésteres de sacarosa de ácidos grasos C_{12} - C_{18} .

Se puede seleccionar un tensioactivo a partir de ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietilenado. El tensioactivo especialmente preferido es Polisorbato 20, 21, 40, 60, 65, 80, 81 y 85, el más preferido Polisorbato 20 y 80, especialmente Polisorbato 80.

En la composición divulgada en el presente documento, un tensioactivo puede estar presente en la composición farmacéutica en una cantidad entre 0,001 y 0,1 % (p/p), más preferentemente entre 0,005 y 0,05 (p/p), especialmente 0,01 % (p/p).

Ejemplos de una sal inorgánica típica incluyen: cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, fosfato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de amonio, fosfato de potasio y bicarbonato de sodio o cualquier otra sal de sodio, potasio o calcio. Preferentemente, la sal inorgánica es cloruro de sodio.

- 5 En la composición divulgada en el presente documento, una sal orgánica puede estar presente en la composición farmacéutica en una cantidad entre 10 y 200 mM, más preferentemente 60 y 130 mM, especialmente 85 mM.

10 Ejemplos de agente reductor incluyen N-acetilcisteína, N-acetilhomocisteína, ácido tióctico, tioglicerol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico y una de sus sales, tiosulfato de sodio, glutatión, y un ácido tioalcanoico C1-C7.

Ejemplos de antioxidante incluyen ácido eritórico, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, alfa-tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico y una de sus sales, palmitato del ácido L-ascórbico, estearato del ácido L-ascórbico, bisulfato de sodio, sulfato sódico, galato de triamilo y galato de propilo.

15 Ejemplos de agente quelante incluyen etilendiaminetetraacetato disódico (EDTA), pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio.

20 Ejemplos de estabilizante incluyen creatinina, un aminoácido seleccionado entre histidina, alanina, ácido glutámico, glicina, leucina, fenilalanina, metionina, isoleucina, prolina, ácido aspártico, arginina, lisina y treonina, un hidrato de carbono seleccionado entre sacarosa, trehalosa, sorbitol, xilitol y manosa, tensioactivos seleccionados entre polietilenglicol (PEG; por ejemplo, PEG3350 o PEG4000) o ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxi-etilenado (por ejemplo, Polisorbato 20 o Polisorbato 80), o cualquiera de sus combinaciones.

- 25 En una realización preferida, el estabilizante comprende un único hidrato de carbono como se ha definido anteriormente en el presente documento (por ejemplo, trehalosa).

En una realización alternativamente preferida, el estabilizante comprende un aminoácido junto con un hidrato de carbono (por ejemplo, trehalosa y alanina o trehalosa, alanina y glicina).

30 En una realización preferida de forma alternativa, el estabilizante comprende un aminoácido junto con un hidrato de carbono y un tensioactivo (por ejemplo, trehalosa, alanina y PEG3350 o trehalosa, prolina y PEG3350 o trehalosa, alanina y Polisorbato 80 o trehalosa, prolina y Polisorbato 80 o trehalosa, alanina, glicina y PEG3350 o trehalosa, alanina, glicina y Polisorbato 80).

35 En otra realización preferida de forma alternativa, el estabilizante comprende un aminoácido junto con un tensioactivo (por ejemplo, alanina y PEG3350 o alanina, glicina y PEG3350).

40 En otra realización preferida de forma alternativa, el estabilizante comprende un hidrato de carbono junto con un tensioactivo (por ejemplo, trehalosa y PEG3350 o trehalosa y Polisorbato 80).

45 Ejemplos de conservante incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio) en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), cloruro de bencetonio, alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden comprender un anticuerpo contra IL-13, un tensioactivo y una sal inorgánica tamponados a un pH de $5,5 \pm 0,1$ con tampón acetato.

- 50 Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden comprender un anticuerpo contra IL-13, cloruro de sodio y Polisorbato 80 tamponados a un pH de $5,5 \pm 0,1$ con tampón acetato de sodio.

55 Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden comprender 50 mg/ml de un anticuerpo contra IL-13, cloruro de sodio 85 mM y Polisorbato 80 al 0,01 % (p/p) tamponados a un pH de $5,5 \pm 0,1$ con tampón acetato de sodio 50 mM.

60 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un proceso para purificar un anticuerpo contra IL-13 que comprende una o más etapas de separación cromatográfica en la que cada una de dichas etapas de separación comprende la elución con un tampón de elución que comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables tamponados a un pH de 3,5-7,0 con tampón acetato.

65 Preferentemente, la una o más etapas de separación cromatográfica se seleccionan entre cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico y aniónico), cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, cromatografía con fenilo), cromatografía con hidroxipatito, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad con metal inmovilizado, cromatografía de interacción hidrófila, cromatografía de adsorción tiofílica,

cromatografía de adsorción de euglobulina, cromatografía de ligando con colorante o cromatografía de boronato inmovilizado. De la manera más preferida, se llevó a cabo la separación cromatográfica mediante cromatografía de afinidad de proteína A seguida de cromatografía de intercambio catiónico (utilizando, por ejemplo, una matriz de sefarosa-SP) seguido por cromatografía de intercambio aniónico (utilizando, por ejemplo, una matriz de sefarosa-Q).

5 Preferentemente, el uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden una sal inorgánica tal como cloruro de sodio.

10 Preferentemente, la sal inorgánica está presente en el tampón de elución en una cantidad de entre 10 y 200 mM, más preferentemente 60 y 130 mM, especialmente 85 mM.

Ejemplos de tampones alternativos que controlan el pH en el intervalo de 3,5-7,0 incluyen succinato, gluconato, histidina, citrato, fosfato y otros tampones ácidos orgánicos.

15 Preferentemente, el tampón es tampón acetato, más preferentemente acetato de sodio.

Preferentemente, el tampón acetato está presente en el tampón de elución en una cantidad entre 1 y 100 mM, más preferentemente 30 y 70 mM, especialmente 50 mM.

20 De la manera más preferida, el tampón de elución comprende acetato de sodio 50 mM y cloruro de sodio 85 mM tamponado a un pH de $5,5 \pm 0,1$.

25 Un ácido nucleico que codifica cualquier anticuerpo contra IL-13 de la invención (por ejemplo, una CDR o un conjunto de CDR o un dominio VH o dominio VL o sitio de unión del antígeno al anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG4 cuando se proporcione), puede expresarse cultivando en condiciones adecuadas células hospedadoras recombinantes que contienen dicho ácido nucleico. Tras la producción mediante expresión, puede aislarse y/o purificarse un dominio VH o VL, o un miembro de unión específico usando cualquier técnica adecuada, y luego usarse según sea adecuado.

30 Los miembros de unión específicos, los dominios VH y/o VL, y las moléculas y vectores de ácido nucleico que codifican ácido nucleico se pueden proporcionar aislados y/o purificados, por ejemplo, de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso del ácido nucleico, exento o prácticamente exento de ácido nucleico o de un origen génico distinto de la secuencia que codifica un polipéptido con la función necesaria. El ácido nucleico puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético.

35 La referencia a una secuencia de nucleótidos tal como se define en el presente documento abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U está sustituido por T, salvo que el contexto indique otra cosa.

40 Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en diversas diferentes células hospedadoras son bien conocidos. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, sistemas de levaduras y baculovirus y plantas y animales transgénicos.

45 Las líneas de células de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células NS0 de melanoma de ratón, células YB2/0 de mieloma de rata, células de riñón embrionario humano, células de retina de embrión humano y otras muchas.

50 Preferentemente, dicha línea de células de mamífero es un cultivo de células de mieloma tal como, por ejemplo, células NS0 [Galfre y Milstein Methods Enzymology, 1981. 73, 3]. Las células de mieloma son células de plasmacitoma, es decir, células de un linaje de células linfoides. Una línea de células NS0 ilustrativa es, por ejemplo, la línea de células ECACC n.º 85110503, disponible públicamente de la European Collection of Cell Cultures (ECACC), Centre for Applied Microbiology & Research, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Reino Unido. Se ha descubierto que NS0 es capaz de producir rendimientos de producto muy elevados, en particular, si se usa para la

55 producción de anticuerpos recombinantes.

Una línea de células de mamífero muy preferida es la de células de ovario de hámster chino (CHO). Estas pueden ser deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr) y dependientes por tanto de timidina e hipoxantina para su crecimiento [PNAS, 1990. 77, 4216-4220]. La línea de células CHO dhfr precursora se transfecta con el gen del anticuerpo y el gen dhfr que permite la selección de transformantes de células CHO de fenotipo dhfr positivo. Se llevó a cabo la selección cultivando las colonias en medio desprovisto de timidina e hipoxantina, cuya ausencia evita que crezcan las células sin transformar y que las células transformadas vuelvan a recuperar la ruta del folato sorteando de esta forma el sistema de selección. Estos transformantes expresan normalmente bajos niveles del producto génico debido a la integración simultánea de ambos genes transfectados. Los niveles de expresión del gen del anticuerpo pueden aumentarse mediante amplificación utilizando metotrexato (MTX). Este fármaco es un inhibidor directo de la enzima dhfr y permite el aislamiento de colonias resistentes que amplifican su número de

copias del gen dhfr lo suficiente para sobrevivir en estas condiciones. Como los genes dhfr y del anticuerpo están más estrechamente unidos en los transformantes originales, existe usualmente una amplificación simultánea y, por tanto, una expresión aumentada del gen del anticuerpo deseado.

- 5 Otro sistema de selección para su uso con células CHO o de mieloma es el sistema de amplificación de la glutamina sintetasa (GS) descrito en el documento WO 87/04462. Este sistema implica la transfección de una célula con un gen que codifica la enzima GS y el gen del anticuerpo deseado. A continuación se seleccionan células que crecen en medio exento de glutamina. Estos clones seleccionados se someten a continuación a la inhibición de la enzima GS usando metionina sulfoximina (MSX). Las células, para sobrevivir, amplificarán el gen GS con amplificación
10 simultánea del gen que codifica el anticuerpo.

- La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariotas tales como *E. coli* está bien establecida en la técnica. Para una revisión, véase por ejemplo Pluckthun, A. Bio/Technology 1991. 9, 545-551. La expresión en células eucarióticas en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica como opción
15 para producir un miembro de unión específico [Chadd, H.E. y Chamow, S.M., Current Opinion in Biotechnology 2001. 12, 188-194; Andersen, D.C. y Krummen, L. Current Opinion in Biotechnology 2002. 13, 117; Larrick, J.W. y Thomas, D.W. Current opinion in Biotechnology 2001. 12, 411-418].

- Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras adecuadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes
20 marcadores y otras secuencias según sea adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, virus, por ejemplo, fagos o fagémidos, según sea adecuado. Para detalles adicionales, véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual: 3ª edición, Sambrook y Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas,
25 se describen en detalle en Current Protocols in Molecular Biology, segunda edición, Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons, 1988, Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons, 4ª edición 1999.

- La introducción de un ácido nucleico en una célula hospedadora puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección y transducción mediada por liposomas usando un retrovirus u otro virus, por ejemplo, vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. La introducción de ácido nucleico en la célula hospedadora, en particular, una célula eucariota, puede utilizar un sistema basado en un virus o un plásmido. El sistema plásmido
30 puede mantenerse episómicamente o puede incorporarse a la célula hospedadora o a un cromosoma artificial [Csonka, E. *et al.*, Journal of Cell Science, 200. 113, 3207-3216; Vanderbyl, S. *et al.*, Molecular Therapy, 2002. 5 (5), 10]. La incorporación puede ser una integración tanto aleatoria como dirigida de una o más copias en loci únicos o múltiples. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación e infección usando bacteriófagos.

- 40 La introducción puede ir seguida de causar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células hospedadoras en condiciones para la expresión del gen.

- En una realización, el ácido nucleico divulgado en el presente documento se integra en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula hospedadora.
45

La integración puede promoverse mediante la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas convencionales.

- 50 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un uso de una composición de anticuerpo farmacéutico, como se define en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-13.

- Preferentemente, el trastorno relacionado con IL-13 se selecciona entre asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, fibrosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, esclerodermia, enfermedad inflamatoria del intestino y linfoma de Hodgkin. La composición de la invención puede también utilizarse en el tratamiento de tumores e infecciones víricas como anticuerpos contra IL-13 que inhibirán la inmunosupresión mediada por IL-13. De la manera más preferida, el trastorno relacionado con IL-13 es asma.
55

- La invención proporciona además la composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de un trastorno relacionado con IL-13 que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de anticuerpo farmacéutico como se define en el presente documento.
60

- La invención proporciona además una composición de anticuerpo farmacéutico como se define en el presente documento para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-13.
65

La composición farmacéutica de la invención puede ser una formulación líquida o una formulación liofilizada que se reconstituye antes del uso. Como excipientes para una formulación liofilizada, por ejemplo, se pueden usar alcoholes azucarados o sacáridos (por ejemplo, manitol o glucosa). En el caso de una formulación líquida, la composición farmacéutica de la invención se proporciona usualmente en la forma de recipientes con un volumen definido, incluyendo viales de plástico o vidrio precintados y esterilizados, ampollas y jeringuillas, así como en la forma de recipientes de volumen grande como botellas. Preferentemente, la composición de la invención es una formulación líquida.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar por vía oral, mediante inyección (por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal o intramuscularmente), mediante inhalación, o por vía tópica (por ejemplo, intraocular, intranasal, rectal, en heridas, sobre la piel). Se puede determinar la ruta de administración por las características fisicoquímicas del tratamiento, por consideraciones especiales de la enfermedad por las necesidades para optimizar la eficacia o minimizar los efectos secundarios.

Preferentemente, la composición de la invención se administra mediante inyección subcutánea. Se pretende que el uso del tratamiento no se restrinja a escenarios clínicos. Por lo tanto, puede preferirse también la inyección subcutánea utilizando un dispositivo exento de aguja.

De acuerdo con la invención, las composiciones proporcionadas pueden administrarse a individuos. La administración está preferentemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar un beneficio al paciente. Dicho beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la velocidad y el ciclo de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la posología, etc., es de la responsabilidad de los facultativos generales y otros médicos. Las dosis adecuadas de anticuerpo son bien conocidas en la técnica; [Ledermann, J.A. *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1999. 47, 659-664; Bagshawe, K.D. *et al.*, *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals*, 1991. 4, 915-922].

La dosis precisa dependerá de numerosos factores, incluyendo el tamaño y la localización del área a tratar, la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo completo, fragmento o diacuerpo), y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo de 100 pg a 10 g para aplicaciones sistémicas, y 1 µg a 100 mg para aplicaciones tópicas.

Normalmente, el anticuerpo será un anticuerpo completo, preferentemente el isotipo IgG4.

Una dosis para un tratamiento único de un paciente adulto, puede ajustarse proporcionalmente para niños y lactantes, y también ajustarse para otros formatos de anticuerpos en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces a la semana, semanales o mensuales, a discreción del médico. En realizaciones preferidas de la presente invención, el tratamiento es periódico, y el periodo entre administraciones es aproximadamente de dos semanas o más, preferentemente, aproximadamente tres semanas o más, más preferentemente aproximadamente cuatro semanas o más, o aproximadamente una vez al mes.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los resultados del análisis SDS-PAGE de las muestras del Día 1 de una evaluación de estabilidad de 28 días de la composición de la invención.

La Figura 2 muestra los resultados del análisis SDS-PAGE de las muestras del Día 21 de una evaluación de estabilidad de 28 días de la composición de la invención.

La Figura 3 muestra los resultados del análisis GP-HPLC de las muestras del Día 1 de una evaluación de estabilidad de 28 días de la composición de la invención.

La Figura 4 muestra una amalgama de resultados obtenida a partir del análisis de GP-HPLC de las muestras durante una evaluación de estabilidad de 28 días de la composición de la invención a 2-8 °C.

La Figura 5 muestra una amalgama de resultados obtenida a partir del análisis de GP-HPLC de las muestras durante una evaluación de estabilidad de 28 días de la composición de la invención a 25 °C.

La Figura 6 muestra una amalgama de resultados obtenida a partir del análisis de GP-HPLC de las muestras durante una evaluación de estabilidad de 28 días de la composición cuando se neutraliza con tampones diferentes.

La Figura 7 muestra los resultados del análisis IERF de las muestras del Día 28 de una evaluación de estabilidad de 28 días de la composición de la invención.

La Figura 8 muestra los resultados del análisis de HPLC con filtración de gel de una evaluación de estabilidad de

12 meses de diferentes formulaciones almacenadas a -70 °C.

La Figura 9 muestra los resultados del análisis de HPLC con filtración de gel de una evaluación de estabilidad de 12 meses de diferentes formulaciones almacenadas a +5 °C.

La Figura 10 muestra los resultados del análisis de HPLC con filtración de gel de una evaluación de estabilidad de 12 meses de diferentes formulaciones almacenadas a +25 °C.

La Figura 11 muestra los resultados del análisis de HPLC con filtración de gel de una evaluación de estabilidad de 8 semanas de diferentes formulaciones almacenadas a +37 °C.

La Figura 12 muestra los resultados del análisis de HPLC con filtración de gel de una evaluación de estabilidad de 5 días de diferentes formulaciones almacenadas a +45 °C.

La Figura 13 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE reducido a 0, 6 y 12 meses durante una evaluación de estabilidad de 12 meses de diferentes formulaciones cuando se almacenan a -70 °C.

La Figura 14 muestra el porcentaje de abundancia de las cadenas pesada y ligera de BAK502G9 tras el análisis de SDS-PAGE reducido en la Figura 13 cuando se almacena a -70 °C.

La Figura 15 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE reducido a 0, 6 y 12 meses durante una evaluación de estabilidad de 12 meses de diferentes formulaciones cuando se almacenan a +5 °C.

La Figura 16 muestra el porcentaje de abundancia de las cadenas pesada y ligera de BAK502G9 tras el análisis de SDS-PAGE reducido en la Figura 15 cuando se almacena a +5 °C.

La Figura 17 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE reducido a 0, 6 y 12 meses durante una evaluación de estabilidad de 12 meses de diferentes formulaciones cuando se almacenan a +25 °C.

La Figura 18 muestra el porcentaje de abundancia de las cadenas pesada y ligera de BAK502G9 tras el análisis de SDS-PAGE reducido en la Figura 17 cuando se almacena a +25 °C.

La Figura 19 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE reducido a 0 y 8 semanas durante una evaluación de estabilidad de 8 semanas de diferentes formulaciones cuando se almacenan a +37 °C.

La Figura 20 muestra el porcentaje de abundancia de las cadenas pesada y ligera de BAK502G9 tras el análisis de SDS-PAGE reducido en la Figura 19 cuando se almacena a +37 °C.

La Figura 21 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE reducido a 0 y 5 días durante una evaluación de estabilidad de 5 días de diferentes formulaciones cuando se almacenan a +45 °C.

La Figura 22 muestra el porcentaje de abundancia de las cadenas pesada y ligera de BAK502G9 tras el análisis de SDS-PAGE reducido en la Figura 21 cuando se almacena a +45 °C.

La Figura 23 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE no reducido a 0, 6 y 12 meses durante una evaluación de estabilidad de 12 meses de diferentes formulaciones cuando se almacenan a -70 °C.

La Figura 24 muestra el porcentaje de abundancia del monómero BAK502G9 intacto tras el análisis de SDS-PAGE no reducido en la Figura 23 cuando se almacena a -70 °C.

La Figura 25 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE no reducido a 0, 6 y 12 meses durante una evaluación de estabilidad de 12 meses de diferentes formulaciones cuando se almacenan a +5 °C.

La Figura 26 muestra el porcentaje de abundancia del monómero BAK502G9 intacto tras el análisis de SDS-PAGE no reducido en la Figura 25 cuando se almacena a +5 °C.

La Figura 27 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE no reducido a 0, 6 y 12 meses durante una evaluación de estabilidad de 12 meses de diferentes formulaciones cuando se almacenan a +25 °C.

La Figura 28 muestra el porcentaje de abundancia del monómero BAK502G9 intacto tras el análisis de SDS-PAGE no reducido en la Figura 27 cuando se almacena a +25 °C.

La Figura 29 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE no reducido a 0 y 8 semanas durante una evaluación de estabilidad de 8 semanas de diferentes formulaciones cuando se almacenan a +37 °C.

La Figura 30 muestra el porcentaje de abundancia del monómero BAK502G9 intacto tras el análisis de SDS-

PAGE no reducido en la Figura 29 cuando se almacena a +37 °C.

La Figura 31 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE no reducido a 0 y 5 días durante una evaluación de estabilidad de 5 días de diferentes formulaciones cuando se almacenan a +45 °C.

La Figura 32 muestra el porcentaje de abundancia del monómero BAK502G9 intacto tras el análisis de SDS-PAGE no reducido en la Figura 31 cuando se almacena a +45 °C.

La presente invención se ilustrará ahora, meramente a modo de ejemplo, con referencia a los siguientes métodos y ejemplos.

Ejemplo 1: Expresión de BAK502G9

BAK502G9 se expresó en una línea de células GS NS0 de una manera análoga a los procedimientos descritos en los documentos WO 87/04462 y WO 2004/076485 y proporcionó un sobrenadante del cultivo que contenía 598 mg/l de anticuerpo BAK502G9.

Ejemplo 2: Purificación de BAK502G9

(a) purificación de rmp Proteína A Sefarosa

La columna utilizada para la etapa de la cromatografía de flujo rápido de rmp Proteína A Sefarosa tenía un diámetro de 2,6 cm, empaquetada en cloruro de sodio al 0,9 % P_{V} , con una altura del lecho de 14,5 cm que proporciona un volumen de columna de 77 ml. La resina se obtuvo de GE Healthcare / Amersham Biosciences 17-5138. Se llevó a cabo la cromatografía utilizando una bomba P-50 de Amersham Biosciences, un detector UV1 y una celda de flujo. La columna se limpió con clorhidrato de guanidina 6M antes del uso.

La columna de flujo rápido de rmp Proteína A Sefarosa se equilibró posteriormente con 350 ml de solución salina tamponada con fosfato pH 7,2, tras lavar con agua y limpiar. 2,6 l de sobrenadante del cultivo se cargaron directamente sobre la columna a 200 cm / hora y temperatura ambiente.

A continuación, la columna se lavó con 567 ml de solución salina tamponada con fosfato pH 7,2 seguido por 568 ml de acetato de sodio 50 mM pH 5,55. El anticuerpo BAK502G9 se eluyó a partir de la columna lavando con 380 ml de acetato de sodio 50 mM, pH 3,75. Tras la elución, la columna se lavó con ácido acético 50 mM pH 3,0.

El pico de elución se recogió entre un máximo del 2 % de deflexión UV en la pendiente ascendente y descendente del pico. Se recuperaron 1,5 g de anticuerpo BAK502G9 en 217 ml.

(b) inactivación vírica a pH bajo

El eluato de flujo rápido de la rmp Proteína A Sefarosa se ajustó a pH 3,70 con 173 ml de ácido acético 100 mM. El eluato ajustado se dejó reposar a continuación durante 60 minutos para la inactivación vírica. Tras este tiempo, el eluato ajustado se neutralizó con 437 ml de hidróxido de sodio 50 mM a pH 5,50 y se filtraron 0,22 μm utilizando una unidad de filtración stericup de Millipore (número de producto SCGPU11RE). Se recuperaron 1,4 g de anticuerpo BAK502G9 en 823 ml.

(c) Purificación de Sefarosa SP

La columna utilizada para la etapa de cromatografía de flujo rápido de Sefarosa SP tenía un diámetro de 1,6 cm, empaquetada en solución salina tamponada con fosfato pH 7,2, con una altura del lecho de 15,5 cm que proporciona un volumen de columna de 31 ml. La resina se obtuvo de GE Healthcare / Amersham Biosciences 17-0729. Se llevó a cabo la cromatografía utilizando una bomba P-50 de Amersham Biosciences, un detector UV1 y una celda de flujo. Se limpió la columna con hidróxido de sodio 0,5 M antes del uso.

La columna de flujo rápido de Sefarosa SP se equilibró posteriormente con 145 ml de acetato de sodio 50 mM pH 5,50, tras lavar con agua y limpiar.

400 ml del anticuerpo BAK502G9 como eluato de rmp Proteína A neutralizado se cargaron directamente sobre la columna a 200 cm / hora y temperatura ambiente.

A continuación se lavó la columna con 302 ml de acetato de sodio 50 mM + cloruro de sodio 30 mM pH 5,50.

El anticuerpo BAK502G9 se eluyó a partir de la columna lavando con 150 ml de acetato de sodio 50 mM + cloruro de sodio 85 mM pH 5,50. Tras la elución, la columna se lavó con acetato de sodio 50 mM + cloruro de sodio 2M pH 5,50.

El pico de elución se recogió entre un máximo del 2 % de deflexión UV en la pendiente ascendente y un 30 % en la

pendiente descendente del pico. Se filtraron 0,22 µm del eluato utilizando una unidad de filtración steriflip de Millipore (número de producto SCGPOO525). Se recuperaron 0,67 g de anticuerpo BAK502G9 en 54 ml.

- 5 Esta etapa de proceso se repitió con los restantes 392 ml de anticuerpo BAK502G9 como eluato de rmp Proteína A neutralizado. Se recuperaron 0,67 g más de anticuerpo BAK502G9 en 54 ml. Los dos eluatos de Sefarosa SP filtrados se combinaron antes de la siguiente etapa.

(d) Cromatografía de flujo rápido de sefarosa Q

- 10 La columna utilizada para la etapa de cromatografía de flujo rápido de sefarosa Q tenía un diámetro de 1,6 cm, empaquetada en solución salina tamponada con fosfato pH 7,2, con una altura del lecho de 13,3 cm que proporciona un volumen de columna de 27 ml. La resina se obtuvo de GE Healthcare / Amersham Biosciences 17-0510. Se llevó a cabo la cromatografía utilizando una bomba P-50 de Amersham Biosciences, un detector UV1 y una celda de flujo. Se limpió la columna con hidróxido de sodio 0,5 M antes del uso.

- 15 La columna de flujo rápido de Sefarosa Q se equilibró posteriormente con 138 ml de acetato de sodio 50 mM + cloruro de sodio 85 mM pH 5,50, tras lavar con agua y limpiar.

- 20 44 ml del anticuerpo BAK502G9 como eluato de sefarosa SP se cargaron directamente sobre la columna a 200 cm / hora y temperatura ambiente.

- Se emprendió la elución isocrática del anticuerpo BAK502G9 lavando la columna con 124 ml de acetato de sodio 50 mM + cloruro de sodio 85 mM pH 5,50. Tras la elución, la columna se lavó con acetato de sodio 50 mM + cloruro de sodio 2M pH 5,50.

- 25 El pico de elución se recogió entre un máximo del 2 % de deflexión UV en la pendiente ascendente y un 2 % en la pendiente descendente del pico. Se filtraron 0,22 µm del eluato utilizando una unidad de filtración stericup de Millipore (número de producto SCGPU01RE). Se recuperaron 0,52 g de anticuerpo BAK502G9 en 88 ml. Esta etapa de proceso se repitió con los restantes 44 ml de anticuerpo BAK502G9 como eluato de Sefarosa SP neutralizado. Se recuperaron 0,54 g más de anticuerpo BAK502G9 en 51 ml. A continuación se combinaron los dos eluatos de Sefarosa Q filtrados.

(e) Concentración

- 35 Se obtuvo el producto en acetato de sodio 50 mM + cloruro de sodio 85 mM pH 5,50 y no requirió diafiltración.

- 95,31 g de anticuerpo BAK502G9 como eluato de Sefarosa Q en 17,5 l se concentraron hasta 1,5 l. Se utilizaron un sistema A Pellicon 2 TFF de Millipore y una membrana de 30 KDa 0,1 M² (Millipore P2B030A01). A continuación se recuperó el anticuerpo BAK502G9 a partir del equipo, el equipo se lavó a continuación con tampón usando acetato de sodio 50 mM + cloruro de sodio 85 mM pH 5,50. A continuación se combinó el anticuerpo concentrado con el lavado del tampón. Se añadieron 1,67 ml de Polisorbato 80 al 10 % p/v al combinado para dar una concentración final de Polisorbato 80 del 0,01 % p/v. A continuación se filtraron 0,22 µm del combinado. Se recuperaron 91,6 g de anticuerpo BAK502G9 en 1,67 l.

45 (f) Materiales utilizados

Los productos químicos utilizados para preparar los anteriores tampones fueron del siguiente modo:

- 50 Clorhidrato de guanidina. Sigma Aldrich. G4505
Hidrógeno ortofosfato de disodio. VWR. 1038349
Hidrógeno ortofosfato de disodio. VWR. 102454R
Acetato de sodio 3-hidrato. VWR. 102354X.
Cloruro de sodio. VWR. 10241AP.
Ácido acético. VWR. 10001CU.
55 Polisorbato 80. J. T. Baker. 7394.

Ejemplo 3: Análisis de estabilidad en el día 28

Metodología

- 60 Se llevó a cabo la cromatografía de rmp Proteína A como se define en la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1: Parámetros de la cromatografía de la Proteína A

Matriz:	rmp Proteína A Sefarosa
Altura del lecho:	14,2 cm
Diámetro de la columna	5,0 cm
Volumen de la columna	278 ml
Caudal lineal:	150 cm/h
Tampón de equilibrado y VC:	Solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2, 5 VC
Material de carga:	Cultivo recogido clarificado.
Capacidad de carga (mg de IgG / ml de matriz):	16,6 mg/ml de matriz
Tampón 1 de lavado y VC:	Solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2, 7,5 VC
Tampón 2 de lavado y VC:	acetato de sodio 50 mM, pH 5,50 ± 0,10, 7,5 VC
Tampón de elución:	acetato de sodio 50 mM, pH 3,75 ± 0,10, 1,6 VC
Tampón de protección / limpieza y VC:	acetato de sodio 50 mM, pH 3,0 ± 0,10, 2 VC.

Se necesitaron 1,6 VC de tampón de elución para eluir el pico y para devolver la absorbancia a < 2 % deflexión de la escala completa (AuFS). Después de esto se cambió el tampón a tampón de protección.

A continuación se llevó a cabo la inactivación vírica a pH bajo utilizando el eluato de Proteína A como se muestra en la Tabla 2 siguiente:

Tabla 2: Inactivación vírica a pH bajo

Material de partida:	Eluato de proteína A
reducción del pH:	A pH 3,70
Tampón para la reducción del pH:	ácido acético 100 mM
Velocidad de adición:	8,6 ml/min (19,0 ml/min/l de eluato)
Tiempo de mantenimiento a pH bajo:	60 minutos después del ajuste del pH
Neutralización tras la inactivación vírica:	Hasta pH 5,48 mediante la adición gradual de hidróxido de sodio 100 mM.
Velocidad de adición:	17,8 ml/min (39,3 ml/min/l de eluato - ajustado para el muestreo)
Filtración posterior a la neutralización:	Millipak 20

Todas las muestras se almacenaron en recipientes Hyclone BioProcess de 200 ml se prepararon de polietileno con una tubería de entrada y de salida C-flex unida.

Además, una muestra de 50 ml de eluato de Proteína A inactivada vírica se neutralizó con el tampón original (hidróxido de sodio 50 mM) y se almacenó en un recipiente de bioproceso de 2 a 8 °C durante veintiocho días antes del análisis.

Todas las muestras se almacenaron en una habitación fría de clase 100.000 (2 a 8 °C, vigilada con registrador de gráficos y alarma) o en una incubadora ajustada a 25 °C, según sea adecuado.

Hubo cinco puntos temporales y dos temperaturas de almacenamiento (2 a 8 °C y 25 °C) es decir, diez puntos de muestreo independientes.

El eluato de Proteína A neutralizado filtrado se dividió en diez lotes; almacenándose cinco lotes a cada una de las temperaturas. Un recipiente adicional de eluato de Proteína A neutralizado sin filtrar se almacenó de 2 a 8 °C.

Para rellenar cada recipiente de bioproceso, el eluato de Proteína A neutralizado se bombeó a través de un filtro Millipak de 0,2 µm en un recipiente de bioproceso de 200 ml. Cada recipiente de bioproceso se rellenó con

aproximadamente 100 ml para imitar la relación entre el producto y la superficie de contacto prevista para la producción final a escala de 2.000 l.

5 Se utilizó un recipiente de bioproceso para el muestreo para cada temperatura y cada punto temporal y se tuvo cuidado de no dejar material en la tubería durante el almacenamiento.

Se retiró un recipiente de bioproceso correspondiente a cada temperatura en los días 1, 3, 15, 21 y 28. Se dejó que el contenido de cada recipiente de bioproceso alcanzara la temperatura ambiente antes del muestreo.

10 Se tomaron muestras en recipientes Bixoux o tubos Falcon de 50 ml. Los primeros ml de muestra se descartaron, ya que podrían haber tenido algún contacto con la tubería durante el almacenamiento.

El posterior muestreo de los recipientes que contenían el material restante se congeló a -70 °C.

15 Se llevó a cabo el siguiente análisis en el día de cada punto temporal para cada temperatura de almacenamiento para determinar la comparabilidad de estas muestras entre sí y el patrón de referencia. Se utilizó un vial nuevo de patrón de BAK502G9 en cada punto temporal con fines comparativos para la estabilidad del material de estudio. La referencia se descongeló a temperatura ambiente desde almacenamiento a -70 °C. Se sabe que los niveles del multímero pueden ser altos poco después de la descongelación de este anticuerpo, de tal manera que se llevó a cabo el análisis de GP-HPLC a continuación.

(A) Análisis de turbidez

25 Se evaluó la turbidez como una medida de degradación de la proteína en el tiempo y sirve por tanto como una útil evaluación de la estabilidad de la composición de la invención.

Se midió la turbidez tomando la absorbancia promedio de la muestra entre A340 y 360nm (Eckhardt *et al.* 1993). Este ensayo se llevó a cabo sin filtración adicional.

30 Los datos obtenidos a partir de la cromatografía de rmp Proteína A se resumen en la Tabla 3 y el cromatograma se muestra en la Figura 1.

Tabla 3: datos de la cromatografía de rmp Proteína A

Detalles de la etapa	Resultado
Volumen de la columna	278 ml
Volumen de carga total	3204 ml
Producto total cargado	4620 mg
Volumen de eluato	453 ml (1,6 VC)
Concentración de eluato	8,42 mg/ml
pH en la elución	4,40
Volumen de ácido acético 100 mM añadido	665 ml (2,4 VC)
Volumen de hidróxido de sodio 100 mM añadido	838 ml (3,0 VC; 3,2 VC ajustado*)
Volumen previo en la filtración del proceso	1900 ml* (6,8 VC)
Concentración posterior en la filtración del proceso	2,28 mg/ml
Producto total posterior en la filtración del proceso	4327 mg
Porcentaje de recuperación posterior en la filtración del proceso	93,7 %
*se retiraron 50 ml del eluato inactivado por virus para el ajuste con hidróxido de sodio 50 mM. El volumen final se muestreó posteriormente.	

35 Se llevó a cabo la cromatografía de rmp Proteína A como se esperaba generando volúmenes de tampones comparables a los que se observan a gran escala. El eluato neutralizado fue visiblemente más turbio que el que se observa usualmente con el eluato neutralizado con hidróxido de sodio 50 mM. Durante la filtración en los recipientes de bioproceso, se comenzó a observar precipitación, esto se produjo en una hora de neutralización.

40 No se evaluó la turbidez hasta después de este tiempo. La recuperación estuvo en el intervalo esperado tras la filtración.

Se evaluaron todas las muestras de eluato para la turbidez en el día uno. Los eluatos filtrados almacenados a ambas temperaturas se evaluaron para la turbidez en los días: uno, tres, quince, veintiuno y veintiocho. Además, los eluatos almacenados sin filtrar (ajustados tanto con hidróxido de sodio 50 mM como hidróxido de sodio 100 mM) se evaluaron para la turbidez antes y después de la filtración en el día veintiocho. En la Tabla 4 se muestran los resultados del análisis de turbidez donde puede observarse que aunque no hubo un aumento notable en la turbidez de la muestra del día veintiocho almacenada a 25 °C, las muestras fueron generalmente estables a 25 °C durante al menos 21 días.

Tabla 4: Mediciones de turbidez del proceso y muestras del estudio de estabilidad

Muestra		Turbidez ave		Categoría
Eluato sin ajustar		0,0640		Opalescente
Virus inactivado		0,0247		Ligeramente opalescente
Neutralizado antes de la filtración		0,2856		Turbio
Eluato filtrado		0,0093		Transparente
Día	2 a 8 °C		25 °C	
	Turbidez	Categoría	Turbidez	Categoría
Día uno.	0,0093	Transparente	0,0132	Transparente
Día tres.	0,0115	Transparente	0,0176	Ligeramente opalescente
Día quince.	0,0208	Ligeramente opalescente	0,0203	Ligeramente opalescente
Día veintiuno.	0,0120	Transparente	0,0202	Ligeramente opalescente
Día veintiocho	0,0140	Transparente	0,0412	Opalescente

(B) Análisis de la concentración de proteína

Se midió la concentración de IgG y se calculó utilizando la absorbancia a 280 nm y un coeficiente de extinción de $E_{1\text{cm}}^{0,1\%} = 1,723$.

Los eluatos que se filtraron en el momento de la neutralización no se volvieron a filtrar antes de medirse la absorbancia a 280 nm para calcular las concentraciones de proteína. Ya que las turbideces fueron todas bajas se cree que estas no afectarían a los resultados. La absorbancia a 280 nm fue consistente entre las temperaturas de almacenamiento y los puntos temporales que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Concentraciones de proteína de las muestras de eluato

Muestra: Eluato de Proteína A neutralizada filtrada neutralizada con hidróxido de sodio 100 mM Día:	Concentración de proteína (mg/ml)	
	Temperatura	
	2 a 8 °C	25 °C
Uno.	2,28	2,28
Tres.	2,29	2,29
Quince.	2,28	2,29
Veintiuno.	2,29	2,28
Veintiocho.	2,28	2,26
Veintiocho. Vuelta a filtrar.	2,29	-

(C) Análisis de SDS-PAGE

Se analizó SDS-PAGE reducido y no reducido utilizando geles Bis-Tris NuPAGE del 4 al 12 %. Se analizaron los geles utilizando tampón de análisis MES y se tiñeron con gel Pierce código azul.

El análisis de SDS-PAGE demostró variaciones en los niveles de la mitad del anticuerpo, pero no existe tendencia

evidente y es probable que estén comprendidos en la variación del ensayo (véanse las Figuras 1 y 2 y las Tablas 6 y 7). En el día veintiuno, se observaron algunas bandas menores adicionales en la muestra a 25 °C. Estas bandas no se observaron en el día veintiocho. por tanto, estas pueden estar en los límites de detección del ensayo. Estas bandas pueden corresponder con los picos adicionales pequeños que se observan en la GP-HPLC (véase el Ejemplo 3D).

Las muestras no se analizaron al final del estudio, ya que no sería posible distinguir entre diferencias que estaban presentes en la muestra original o que eran un resultado del almacenamiento más largo. Se analizó un vial del patrón de referencia descongelado recientemente de cada gel. Este fue comparable entre los diferentes puntos temporales indicando que el análisis se había llevado a cabo como se esperaba. Es también notable que las bandas extra que se observan en el día veintiuno, de la muestra a 25 °C, no se observan en el patrón de referencia o la muestra de 2 a 8 °C, que se analiza del mismo gel. Para una mayor claridad, todas las bandas en la Figura 2 se indican con un círculo.

Tabla 6: Resultados de densitometría de SDS-PAGE, muestras reducidas

Día	Muestra	Porcentaje			
		Cadena pesada	Cadena ligera	Mitad de anticuerpo	Otros
Uno.	Referencia.	61,1	37,2	1,7	0,0
	2 a 8 °C	61,3	37,4	1,2	0,0
	25 °C	61,5	37,5	1,0	0,0
Tres.	Referencia.	65,7	32,4	1,9	0,0
	2 a 8 °C	64,4	33,4	2,1	0,0
	25 °C	66,0	32,8	1,2	0,0
Quince.	Referencia.	62,7	35,9	1,3	0,0
	2 a 8 °C	62,3	37,3	0,4	0,0
	25 °C	62,4	39,9	0,7	0,0
Veintiuno.	Referencia.	58,2	39,5	2,3	0,0
	2 a 8 °C	57,8	39,9	2,2	0,1
	25 °C	55,9	40,0	2,5	1,6
Veintiocho.	Referencia.	64,4	33,7	1,9	0,0
	2 a 8 °C	66,1	32,5	1,4	0,0
	25 °C	61,2	35,2	1,5	0,0

Tabla 7: Resultados de densitometría de SDS-PAGE, muestras no reducidas

Día	Muestra	Porcentaje		
		Anticuerpo completo	Mitad de anticuerpo	Otros
Uno.	Referencia.	83,2	16,8	0,0
	2 a 8 °C	82,6	17,4	0,0
	25 °C	83,7	16,3	0,0
Tres.	Referencia.	89,8	10,2	0,0
	2 a 8 °C	87,1	12,9	0,0
	25 °C	87,4	12,6	0,0
Quince.	Referencia.	86,0	14,0	0,0
	2 a 8 °C	84,6	15,4	0,0
	25 °C	86,8	13,2	0,0

Veintiuno.	Referencia.	82,5	17,4	0,0
	2 a 8 °C	81,6	17,9	0,5
	25 °C	82,5	15,7	1,8
Veintiocho.	Referencia.	87,1	12,9	0,0
	2 a 8 °C	85,0	14,8	0,0
	25 °C	87,9	11,3	0,0

(D) Análisis de GP-HPLC

Se analizaron las muestras utilizando una columna de exclusión molecular TSK GS3000SW con fosfato de sodio 200 mM y azida de sodio al 0,05 % pH 7,0 como la fase móvil y detección a 280 nm.

todas las fracciones de la cromatografía de Proteína A se evaluaron en el día 1. Los eluatos almacenados a ambas temperaturas se evaluaron a continuación en los días: uno, tres, quince, veintiuno y veintiocho. Se analizaron también las muestras de referencia en todos los puntos temporales. Los eluatos se neutralizaron por separado tanto con hidróxido de sodio 100 mM como con hidróxido de sodio 50 mM en el día uno, pero no se filtraron hasta que se evaluaron en el día veintiocho mediante GP-HPLC.

en la Figura 3 se muestran los cromatogramas procedentes del análisis de GP-HPLC en el día uno. Estos son como se esperaba siendo el eluato final > 95 % de monómero, que cumple la especificación final para BAK502G9.

El análisis de GP-HPLC de las muestras a lo largo del estudio desvelaron un ligero aumento en BAK502G9 truncado (en particular, un pico pequeño que eludía entre 9,9 y 10,3 minutos) a 25 °C (Tabla 8 y Figuras 4 y 5). Los niveles del monómero fueron consistentes entre 97,0 y 98,2 % durante el estudio completo.

Los eluatos neutralizados con hidróxido de sodio 50 mM tenían mayores niveles de monómero (99,2 % de monómero) que el eluato neutralizado con hidróxido de sodio 100 mM (monómero del 97,4 %), siendo ambos mayores que el nivel requerido del 95 % de monómero para el producto final (Tabla 9 y Figura 6).

Se encontró que los resultados obtenidos a partir de la integración automática eran imprecisos, por lo tanto, los cromatogramas de GP-HPLC se reintegraron manualmente.

Tabla 8: GP-HPLC de eluatos almacenados a diferentes temperaturas

Día	2 a 8 °C (porcentaje)			25 °C (porcentaje)		
	Multímero	Monómero	Truncado	Multímero	Monómero	Truncado
1	1,4	98,2	0,4	1,4	98,0	0,7
3	1,7	97,5	0,8	1,0	98,3	0,7
15	1,4	98,0	0,6	1,0	98,0	1,0
21	1,2	98,1	0,6	1,3	97,4	1,3
28	1,2	98,2	0,7	1,5	97,0	1,5

Tabla 9: GP-HPLC de eluatos neutralizados tanto como 100 mM como 50 mM de hidróxido de sodio

Fracción	Multímero (%)	Monómero (%)	truncado (%)
El eluato neutralizado con hidróxido de sodio 100 mM, se filtró y evaluó el día 28	1,4	97,4	1,2
El eluato neutralizado con hidróxido de sodio 50 mM, se filtró y se evaluó el día 28	0,3	99,2	0,5
El eluato filtrado neutralizado con hidróxido de sodio 100 mM se evaluó el día 28	1,4	98,2	0,4

(E): Análisis IEF

Se analizaron las muestras utilizando 10 geles IEF pH3 de Invitrogen, utilizando tampones Invitrogen.

El análisis IEF de BAK502G9 mostró una apariencia consistente a lo largo de este estudio (Figura 7). Se observan tres bandas mayores y dos bandas menores entre pls de 7,1 y 6,4.

(F): Análisis de endotoxinas

Se evaluaron las muestras tomadas en el día veintiocho a ambas temperaturas de almacenamiento para los niveles de endotoxinas utilizando un ensayo LAL.

Los niveles de endotoxinas en muestras almacenadas a ambas temperaturas fueron bajos. Esto demuestra que no ha habido contaminación por bacterias gram-negativas durante el transcurso del estudio.

Eluato almacenado de 2 a 8 °C = 0,87 UE / mg.

Eluato almacenado a 25 °C < 0,44 UE / mg.

Resumen de los resultados del análisis de estabilidad en el día 28

BAK502G9 almacenado durante hasta quince días de 2 a 8 °C o 25 °C es equivalente en todos los ensayos llevados a cabo en el Ejemplo 3. Después de veintidós días se observaron algunas diferencias menores mediante el análisis de SDS-PAGE (Ejemplo 3C) y GP-HPLC (Ejemplo 3D), pero el producto sigue siendo comparable hasta los veintiocho días.

Ejemplo 4: Análisis de estabilidad a los 12 meses

Se llevó a cabo el análisis de estabilidad a los 12 meses de una manera análoga a la descrita para el análisis de estabilidad el día 28 del Ejemplo 3.

El estudio se diseñó para investigar la estabilidad de diferentes concentraciones de BAK502G9 cuando se almacenan a diferentes temperaturas (por ejemplo, -70, +5, +25, +37 y +45 °C). En la Tabla 10 siguiente se muestran las diferentes formulaciones utilizadas en este análisis:

Tabla 10: Composición de formulaciones utilizadas en un análisis de estabilidad a los 12 meses

Formulación	Concentración nominal (mg/ml)	Composición
Control (CF)	10	acetato de sodio 50 mM / cloruro de sodio 85 mM pH 5,5
Ensayo 1A (TF1A)	50	acetato de sodio 50 mM / cloruro de sodio 85 mM / Polisorbato 80 al 0,01 % pH 5,5
Ensayo 1B (TF1B)	100	acetato de sodio 50 mM / cloruro de sodio 85 mM / Polisorbato 80 al 0,01 % pH 5,5
Ensayo 1C (TF1C)	150	acetato de sodio 50 mM / cloruro de sodio 85 mM / Polisorbato 80 al 0,01 % pH 5,5

Se tomaron los análisis de las muestras en puntos temporales variables, por ejemplo, las formulaciones almacenadas a -70, +5, +25 °C se midieron a los 0, 3, 6, 9 y 12 meses, las formulaciones almacenadas a +37 °C se midieron a las 0, 1, 2, 4 y 8 semanas y las formulaciones almacenadas a +45 °C se midieron a los 0, 1, 2 y 5 días.

(A) análisis del pH

se midió el pH utilizando un pH metro PHM220 (Radiometer Analytical) ajustado con un electrodo de pH de volumen pequeño (BDH) y se muestran en las Tablas 11-15 siguientes los resultados de medición del pH de las formulaciones CF, TF1A, TF1B y TF1C a cada temperatura:

Tabla 11: pH después del almacenamiento a -70 °C

Tiempo (meses)	pH			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	5,67	5,52	5,51	5,54
3	5,47	5,48	5,48	NT
6	5,50	5,50	5,48	NT
9	5,56	5,55	5,57	5,58
12	5,46	5,47	5,46	5,46

Tabla 12: pH después del almacenamiento a +5 °C

Tiempo (meses)	pH			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	5,67	5,52	5,51	5,54
3	5,48	5,49	5,49	NT
6	5,49	5,49	5,49	NT
9	5,56	5,56	5,55	5,56
12	5,47	5,47	5,46	5,47

Tabla 13: pH después del almacenamiento a +25 °C

Tiempo (meses)	pH			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	5,67	5,52	5,51	5,54
3	5,49	5,50	5,51	NT
6	5,49	5,50	5,48	NT
9	5,53	5,53	5,55	5,58
12	5,49	5,49	5,48	5,48

5

Tabla 14: pH después del almacenamiento a +37 °C

Tiempo (semanas)	pH			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	5,50	5,52	5,52	5,52
1	5,45	5,46	5,46	NT
2	5,45	5,45	5,47	NT
4	5,46	5,45	5,45	NT
8	5,45	5,45	5,45	5,46

Tabla 15: pH después del almacenamiento a +45 °C

Tiempo (días)	pH			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	5,50	5,52	5,52	5,52
1	5,47	5,48	5,48	NT
2	5,47	5,47	5,46	NT
5	5,48	5,48	5,47	5,49

NE = no ensayado

(B) Análisis de la concentración

10

Se diluyeron las muestras a un nivel adecuado con el tampón relevante y se determinó su absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro HP8453 UV/visible (Agilent Technologies). Los valores de la absorbancia se convirtieron a concentraciones de BAK502G9 utilizando el coeficiente de extinción conocido de 1,723. En las tablas 16-20 siguientes se muestran los resultados de la absorbancia de las formulaciones CF, TF1A, TF1B y TF1C a cada

15

temperatura:

Tabla 16: Concentración de BAK502G9 tras el almacenamiento a -70 °C

Tiempo (meses)	concentración media $\pm$ SD ^a (mg/ml)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	10,8 $\pm$ 0,1	48,9 $\pm$ 0,3	107,4 $\pm$ 0,9	147,7 $\pm$ 4,6
3	11,0 $\pm$ 0,1	52,4 $\pm$ 0,7	112,8 $\pm$ 0,6	NT
6	10,3 $\pm$ 0,1	46,4 $\pm$ 0,6	104,5 $\pm$ 2,1	NT
9	10,6 $\pm$ 0,2	46,9 $\pm$ 0,8	105,8 $\pm$ 0,7	151,8 $\pm$ 1,4
12	10,7 $\pm$ 0,1	50,9 $\pm$ 0,0	109,3 $\pm$ 0,3	152,7

Tabla 17: Concentración de BAK502G9 tras el almacenamiento a +5 °C

Tiempo (meses)	concentración media $\pm$ SD ^a (mg/ml)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	10,8 $\pm$ 0,1	48,9 $\pm$ 0,3	107,4 $\pm$ 0,9	147,7 $\pm$ 4,6
3	10,8 $\pm$ 0,2	51,4 $\pm$ 0,3	110,7 $\pm$ 0,3	NT
6	10,4 $\pm$ 0,2	46,4 $\pm$ 0,9	99,1 $\pm$ 0,9	NT
9	10,6 $\pm$ 0,1	46,6 $\pm$ 0,5	105,9 $\pm$ 0,9	150,2 $\pm$ 0,2
12	10,7 $\pm$ 0,1	50,5 $\pm$ 0,1	112,3 $\pm$ 0,4	156,1 $\pm$ 0,5

5

Tabla 18: Concentración de BAK502G9 tras el almacenamiento a +25 °C

Tiempo (meses)	concentración media $\pm$ SD ^a (mg/ml)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	10,8 $\pm$ 0,1	48,9 $\pm$ 0,3	107,4 $\pm$ 0,9	147,7 $\pm$ 4,6
3	10,8 $\pm$ 0,2	53,8 $\pm$ 0,4	116,2 $\pm$ 0,5	NT
6	10,4 $\pm$ 0,1	46,5 $\pm$ 0,4	102,9 $\pm$ 2,7	NT
9	10,6 $\pm$ 0,2	46,2 $\pm$ 0,9	106,3 $\pm$ 1,2	152,3 $\pm$ 1,9
12	10,2 $\pm$ 0,1	52,0 $\pm$ 0,9	110,8 $\pm$ 0,5	155,8 $\pm$ 1,3

Tabla 19: Concentración de BAK502G9 tras el almacenamiento a +37 °C

Tiempo (semanas)	concentración media $\pm$ SD ^a (mg/ml)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	10,4 $\pm$ 0,1	46,4 $\pm$ 0,4	98,6 $\pm$ 1,2	142,3 $\pm$ 0,8
1	11,1 $\pm$ 0,2	52,1 $\pm$ 0,7	112,1 $\pm$ 0,8	NT
2	11,0 $\pm$ 0,3	51,4 $\pm$ 1,3	118,7 $\pm$ 0,3	NT
4	10,9 $\pm$ 0,3	54,2 $\pm$ 0,4	120,6 $\pm$ 1,0	NT
8	11,0 $\pm$ 0,2	56,2 $\pm$ 1,9	117,2 $\pm$ 0,2	165,8 $\pm$ 1,1

Tabla 20: Concentración de BAK502G9 tras el almacenamiento a +45 °C

Tiempo (días)	concentración media $\pm$ SD ^a (mg/ml)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	10,4 $\pm$ 0,1	46,4 $\pm$ 0,4	98,6 $\pm$ 1,2	142,3 $\pm$ 0,8
1	10,6 $\pm$ 0,2	54,6 $\pm$ 1,7	120,4 $\pm$ 2,4	NT
2	10,7 $\pm$ 0,1	54,7 $\pm$ 1,4	124,9 $\pm$ 1,3	NT
5	10,6 $\pm$ 0,3	54,7 $\pm$ 2,0	122,2 $\pm$ 0,3	151,5 $\pm$ 1,6

^a n = 3
NE = no ensayado

(C) Análisis de HPLC con filtración de gel

Se llevó a cabo la HPLC con filtración de gel en un sistema HP1100 (Agilent Technologies). Una columna TSK-Gel 3000S se equilibró con fosfato de sodio 0,2 M pH 7,5. Se diluyeron las muestras hasta 1 mg/ml con el tampón relevante y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos para eliminar cualquier materia particulada. Se prepararon inyecciones de 3 x 20 µl de cada muestra en la columna, que se analizaron a un caudal de 1 ml/min. Se usó un detector de longitud variable para vigilar la absorbancia a 220 y 280 nm.

En las Figuras 8-12 siguientes se muestran los resultados del análisis con filtración de gel de las formulaciones CF, TF1A, TF1B y TF1C a cada temperatura.

(D) Análisis de SDS-PAGE reducido

se diluyeron las muestras hasta 1 mg/ml con el tampón relevante y se añadieron 16,7 µl a 12,5 µl de tampón de muestra 4X LDS (Invitrogen), 15,8 µl de agua Milli-Q y 5 µl de agente reductor (Invitrogen). Se calentaron las muestras a 95 °C durante un minuto y a continuación se colocaron en hielo. 15 µl de cada muestra se cargaron en un gel BisTris al 4-12 % gel (Invitrogen) en un tanque que contenía 1 x tampón de análisis MES SDS y el gel se analizó durante 35 minutos a una corriente constante de 500 mA. Tras la electroforesis, el gel se retiró de su carcasa, se enjuagó durante 3 x 10 minutos con agua Milli-Q, se tiñó con reactivo de tinción Gelcode® Blue (Pierce) durante un mínimo de una hora y a continuación se destiñó con agua Milli-Q. El gel se fotografió y analizó utilizando un sistema de documentación del gel UVP GDS8000. Se determinó la abundancia relativa de la cadena pesada y la cadena ligera de BAK502G9 en cada muestra.

En las Figuras 13, 15, 17, 19 y 21 se muestran los resultados del análisis de SDS-PAGE reducido de las formulaciones CF, TF1A, TF1B y TF1C en cada temperatura. Se muestran también en las Figuras 14, 16, 18, 20 y 22 las mediciones de la abundancia de las cadenas pesada y ligera de BAK502G9 a cada temperatura.

(E) Análisis de SDS-PAGE no reducido

Se diluyeron las muestras hasta 1 mg/ml con el tampón relevante y se añadieron 16,7 µl a 25 µl de tampón de muestra 2X no reductor (0,125 M Tris pH 6,8, 4 % (p/v) SDS, glicerol al 30 % (v/v), azul de bromofenol al 0,004 % (p/v)), 3,3 µl de agua Milli-Q y 5 µl de yodoacetamida 1 M. Se calentaron las muestras a 95 °C durante un minuto y a continuación se colocaron en hielo. 15 µl de cada muestra se cargaron en un gel BisTris al 4-12 % gel (Invitrogen) en un tanque que contenía 1 x tampón de análisis MES SDS y el gel se analizó durante 35 minutos a una corriente constante de 500 mA. Tras la electroforesis, el gel se retiró de su carcasa, se enjuagó durante 3 x 10 minutos con agua Milli-Q, se tiñó con reactivo de tinción Gelcode® Blue (Pierce) durante un mínimo de una hora y a continuación se destiñó con agua Milli-Q. El gel se fotografió y analizó utilizando un sistema de documentación del gel UVP GDS8000. Se determinó la abundancia relativa del monómero BAK502G9 en cada muestra.

En las Figuras 23, 25, 27, 29 y 31 se muestran los resultados del análisis de SDS-PAGE de las formulaciones CF, TF1A, TF1B y TF1C a cada temperatura. Se muestran también en las Figuras 24, 26, 28, 30 y 32 las mediciones de la abundancia del monómero BAK502G9 intacto a cada temperatura.

(F) Análisis de electrofocalización

Antes de la carga de la muestra, se enfrió el lecho de electroforesis y se prefocalizó un gel IEF a pH 3-10 (Cambrex) durante 10 minutos a 1 W, 2000 V, 150 mA utilizando un generador eléctrico Apelex PS9009TX. Se diluyeron las muestras hasta 1 mg/ml con el tampón relevante. Se colocó una máscara de muestra sobre la superficie del gel y se cargaron 5 µl de cada muestra. El gel se prefocalizó de nuevo y se retiró la máscara de muestra. A continuación el gel se focalizó durante 60 minutos a 25 W, 1500 V, 50 mA. Tras la electroforesis, el gel se fijó con metanol al 50 % (v/v), ácido tricloroacético al 6 % (p/v), ácido 5-sulfosalicílico al 3,6 % (p/v) durante 30 minutos, a continuación se lavó con agua y se secó en un horno a 40-50 °C durante una hora. El gel se tiñó durante 30 minutos utilizando

PhastGel Blue R (Pharmacia; un comprimido disuelto en metanol al 60 % (v/v), se lavó con agua Milli-Q para eliminar el exceso de tinción y a continuación se destiñó durante aproximadamente 3 minutos con ácido acético glacial al 9 % (v/v), solución de etanol al 25 % (v/v). El gel se secó en un horno a 40-50 °C durante una hora. El gel seco se fotografió y analizó utilizando un sistema de documentación del gel UVP GDS8000. Se determinó el rango y el intervalo pl de las isoformas en cada muestra y se muestran en las Tablas 21-25 siguientes los resultados observados con las formulaciones CF, TF1A, TF1B y TF1C a cada temperatura:

Tabla 21: intervalo pl y número de isoformas mediante IEF tras el almacenamiento a -70 °C

Tiempo (meses)	intervalo pl (número de isoformas)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	6,75-7,17 (4)	6,74-7,17 (4)	6,71-7,14 (4)	6,69-7,10 (4)
3	6,39-6,76 (4)	6,39-6,74 (4)	6,38-6,73 (4)	NT
6	6,53-6,78 (4)	6,63-6,85 (4)	6,64-6,88 (4)	NT
9	6,60-6,89 (4)	6,60-6,88 (4)	6,60-6,89 (4)	6,61-6,89 (4)
12	6,67-6,93 (4)	6,64-6,91 (4)	6,65-6,96 (4)	6,69-6,99 (4)

Tabla 22: intervalo pl y número de isoformas mediante IEF tras el almacenamiento a +5 °C

Tiempo (meses)	intervalo pl (número de isoformas)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	6,75-7,17 (4)	6,74-7,17 (4)	6,71-7,14 (4).	6,69-7,10 (4)
3	6,59-6,85 (4)	6,59-6,85 (4)	6,59-6,86 (4)	NT
6	6,66-6,91 (4)	6,65-6,89 (4)	6,68-6,95 (4)	NT
9	6,66-6,94 (4)	6,66-6,94 (4)	6,64-6,90 (4)	6,63-6,89 (4)
12	6,62-6,91 (4)	6,63-6,94 (4)	6,62-6,92 (4)	6,61-6,89 (4)

Tabla 23: intervalo pl y número de isoformas mediante IEF tras el almacenamiento a +25 °C

Tiempo (meses)	intervalo pl (número de isoformas)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	6,75-7,17 (4)	6,74-7,17 (4)	6,71-7,14 (4)	6,69-7,10 (4)
3	6,59-6,80 (4)	6,62-6,83 (4)	6,61-6,84 (4)	NT
6	6,65-6,90 (4)	6,69-6,98 (4)	6,64-6,93 (4)	NT
9	6,62-6,85 (4)	6,61-6,85 (4)	6,64-6,87 (4)	6,64-6,89 (4)
12	6,62-6,85 (4)	6,61-6,86 (4)	6,61-6,86 (4)	6,62-6,88 (4)

Tabla 24: intervalo pl y número de isoformas mediante IEF tras el almacenamiento a +37 °C

Tiempo (semanas)	intervalo pl (número de isoformas)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	6,65-6,95 (4)	6,65-6,93 (4)	6,63-6,92 (4)	6,64-6,93 (4)
1	6,47-6,77 (4)	6,60-6,84 (4)	6,63-6,88 (4)	NT
2	6,57-6,78 (4)	6,56-6,79 (4)	6,58-6,82 (4)	NT
4	6,62-6,84 (4)	6,68-6,95 (4)	6,69-6,98 (4)	NT
8	6,61-6,86 (5)	6,20-6,85 (7)	6,28-6,89 (7)	6,26-6,91(7)

Tabla 25: intervalo pl y número de isoformas mediante IEF tras el almacenamiento a +45 °C

Tiempo (días)	intervalo pl (número de isoformas)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	6,65-6,95 (4)	6,65-6,93 (4)	6,63-6,92 (4)	6,64-6,93 (4)
1	6,61-6,84 (4)	6,64-6,88 (4)	6,64-6,89 (4)	NT
2	6,60-6,85 (4)	6,56-6,78 (4)	6,62-6,85 (4)	NT
5	6,63-6,91 (4)	6,65-6,95 (4)	6,64-6,95 (4)	6,64-6,93 (4)

NE = no ensayado

Resumen de resultados del análisis de estabilidad

Estabilidad a -70 °C

5 CF y TF1A fueron estables durante 12 meses a -70 °C. Los perfiles analíticos fueron similares a los 0 y 12 meses excepto por el % de IgG intacta mediante SDS-PAGE no reducido, que disminuyó desde 95,9 % a t = 0 a 89,9 % a los 12 meses para CF y desde 96,2 % a t = 0 a 89,2 % a los 12 meses para TF1A. Mediante HPLC después de 12 meses, el porcentaje de monómero para las muestras de CF y TF1A fue del 100 %. Las muestras de CF y TF1A desplegaron 4 bandas en IEF tras 12 meses. Los resultados indicaron que CF y TF1A son comparables a esta temperatura.

Estabilidad a 5 °C

15 CF y TF1A fueron estables durante 12 meses a 5 °C. Los perfiles analíticos fueron similares a los 0 y 12 meses excepto por el % de IgG intacta mediante SDS-PAGE no reducido, que disminuyó desde 95,9 % a t = 0 a 89,5 % a los 12 meses para CF y desde 96,2 % a t = 0 a 88,9 % a los 12 meses para TF1A. Mediante HPLC después de 12 meses, el porcentaje de monómero para las muestras de CF y TF1A fue del 100 %. Las muestras de CF y TF1A desplegaron 4 bandas en IEF tras 12 meses. Los resultados indicaron que CF y TF1A son comparables a esta temperatura.

Estabilidad a 25 °C

25 CF y TF1A fueron estables durante 12 meses a 25 °C. El % de IgG intacta mediante SDS-PAGE no reducido disminuyó desde 95,9 % a t = 0 a 89,1 % a los 12 meses para CF y desde 96,2 % a t = 0 a 87,5 % a los 12 meses para TF1A. Existe una banda menor de alto peso molecular (> 220 kDa) en ambas formulaciones en el gel de SDS-PAGE no reducido que no se detectó a t = 0. Mediante HPLC después de 12 meses, el porcentaje de monómero para las muestras de CF y TF1A fue de 98,9 y 96,42 %, respectivamente. Las muestras de CF y TF1A desplegaron 4 bandas en IEF tras 12 meses. Los resultados indicaron que CF y TF1A son comparables a esta temperatura.

Estabilidad a 37 °C

35 CFA y TF1A fueron estables durante 4 semanas a 37 °C, pero fracasaron en cumplir las especificaciones del borrador para algunos parámetros después de 8 semanas, concretamente la pureza mediante SDS-PAGE (ambas formulaciones) y el % de monómero mediante GP-HPLC (TF1A solo; resultado límite). Los resultados indicaron que CF es más estable que TF1a a esta temperatura durante un periodo de 8 semanas.

Estabilidad a 45 °C

40 CF y TF1A fueron estables durante 5 días a 45 °C aunque hubo ligeros cambios en los perfiles analíticos durante este tiempo (algunas bandas menores adicionales en geles de SDS-PAGE e IEF). Los resultados indicaron que CF y TF1A son comparables a esta temperatura durante un periodo de 5 días.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo contra IL-13, tampón acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 85 mM y polisorbato 80 al 0,01 % (p/p) tamponados a un pH de 4,5 a 6,0 con dicho tampón acetato de sodio.
2. Una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 1 en la que el anticuerpo contra IL-13 es un anticuerpo monoclonal humano contra IL-13.
3. Una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde el anticuerpo contra IL-13 está presente en la composición farmacéutica en una cantidad de entre 1 y 200 mg/ml.
4. La composición farmacéutica como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el anticuerpo contra IL-13 comprende un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde
HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos NYGLS;
HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos WISANNGDTNYGQEFQG;
HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos DSSSSWARWFFDL;
LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos GGNIGSKLVH;
LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos DDGDRPS; y
LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos QVWDTGSDPVV.
5. La composición farmacéutica como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el anticuerpo contra IL-13 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos:
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMG
WISANNGDTNYGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARD
SSSSWARWFFDLWGRGTLTVSS;
- y una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos:
- SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGD
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTK
LTVL.
6. Una composición farmacéutica como se define en cualquier reivindicación anterior que está tamponada a un pH de 5,2 a 5,7.
7. Una composición farmacéutica como se define en cualquier reivindicación anterior que está tamponada a un pH de $5,5 \pm 0,1$.
8. Una composición farmacéutica como se define en cualquier reivindicación anterior que comprende 50 mg/ml de un anticuerpo contra IL-13.
9. Una composición farmacéutica como se define en cualquier reivindicación anterior que comprende 100 mg/ml de un anticuerpo contra IL-13.
10. Una composición farmacéutica como se define en cualquier reivindicación anterior que comprende 150 mg/ml de un anticuerpo contra IL-13.
11. Un proceso para purificar un anticuerpo contra IL-13 que comprende una o más etapas de separación cromatográfica en donde cada una de dichas etapas de separación comprende la elución con un tampón de elución que comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables tamponados a un pH de 3,5-7,0 con tampón acetato.
12. Un proceso como se define en la reivindicación 11 en el que las etapas de separación cromatográfica se seleccionan a partir de cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio iónico.
13. Un proceso como se define en la reivindicación 12 en el que se lleva a cabo la separación cromatográfica mediante cromatografía de afinidad de la Proteína A seguida por cromatografía de intercambio catiónico seguida por cromatografía de intercambio aniónico.

14. Un proceso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en el que uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden una sal inorgánica.

15. Un proceso como se define en la reivindicación 14 en el que la sal inorgánica es cloruro sódico presente en el tampón de elución en una cantidad de entre 10 y 200 mM.

16. Un proceso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 en el que el tampón acetato es acetato de sodio presente en el tampón de elución en una cantidad de entre 1 y 100 mM.

17. Un proceso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16 en el que el tampón de elución comprende tampón acetato de sodio 50 mM y cloruro de sodio 85 mM tamponado a un pH de $5,5 \pm 0,1$.

18. Uso de una composición de anticuerpo farmacéutica como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-13.

19. Uso como se ha definido en la reivindicación 18 en el que el trastorno relacionado con IL-13 se selecciona entre asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, fibrosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, esclerodermia, enfermedad inflamatoria del intestino y linfoma de Hodgkin.

20. Uso como se ha definido en la reivindicación 19 en el que el trastorno relacionado con IL-13 es dermatitis atópica.

21. Una composición farmacéutica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-13.

22. La composición de anticuerpo farmacéutica para su uso como se ha definido en la reivindicación 21 en donde el trastorno relacionado con IL-13 se selecciona entre el grupo que consiste en asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, fibrosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, esclerodermia, enfermedad inflamatoria del intestino y linfoma de Hodgkin.

23. La composición de anticuerpo farmacéutica para su uso como se ha definido en la reivindicación 22 en donde el trastorno relacionado con IL-13 es dermatitis atópica.

24. El proceso de la reivindicación 17, en el que el anticuerpo contra IL-13 es un anticuerpo monoclonal humano.

25. El proceso de la reivindicación 17, en el que el anticuerpo contra IL-13 comprende un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos NYGLS;

HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos WISANNGDTNYGQEFQG;

HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos DSSSW ARWFFDL;

LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos GGNIIGSKLVH;

LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos DDGDRPS; y

LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos QVWDTGSDPVV.

26. El proceso de la reivindicación 17, en la que el anticuerpo contra IL-13 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMG
WISANNGDTNYGQEFQGRVTMTTDTSTSTA YMELRSLRSDDTA VYYCARD
SSSSWARWFFDLWGRGTLTVSS;

y una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos:

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQKPGQAPVLVIYDDGD
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTK

LTVL.

27. El proceso de la reivindicación 26, en el que el anticuerpo contra IL-13 está presente tras la elución en una cantidad de aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml o aproximadamente 150 mg/ml.

FIGURA 1: resultados del análisis SDS-PAGE de 28 días para el Día uno

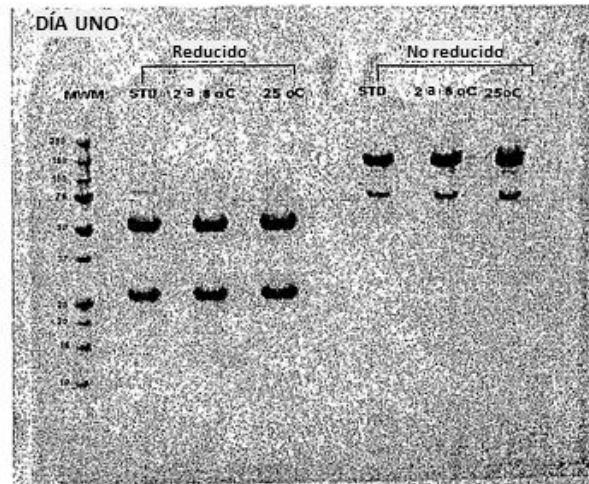


FIGURA 2: resultados del análisis SDS-PAGE de 28 días para el Día veintiuno

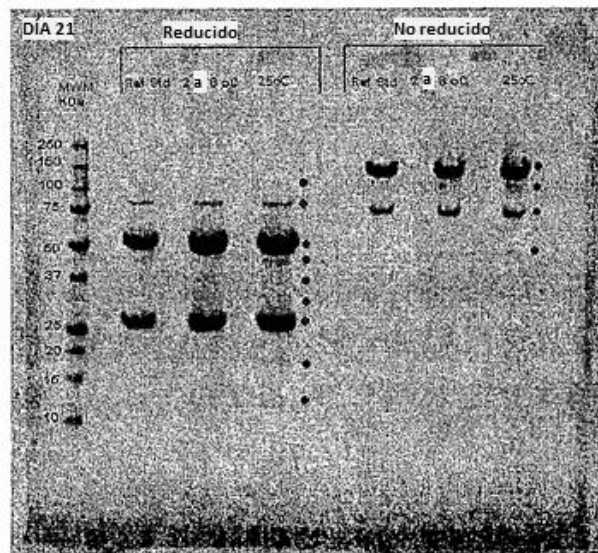


FIGURA 3: análisis GP-HPLC de las fracciones de Proteína A para el Día 1 de 28 días

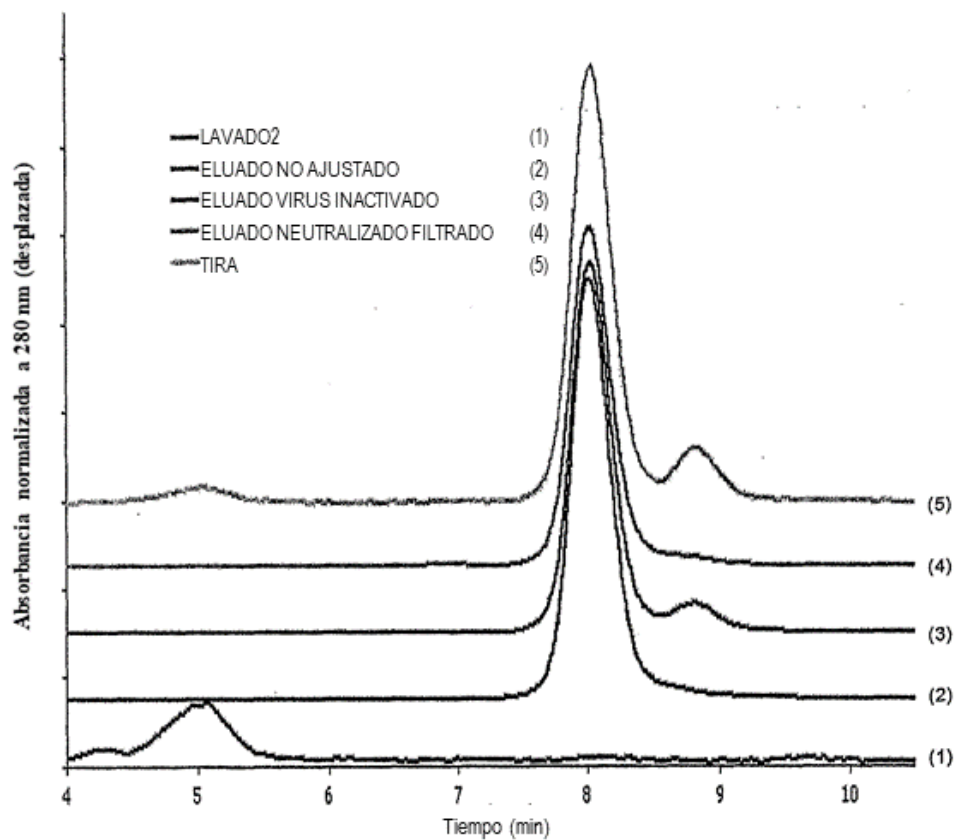


FIGURA 4: ampliación de los cromatogramas del análisis GP-HPLC de 28 días para los eluatos almacenados de 2 a 8 °C

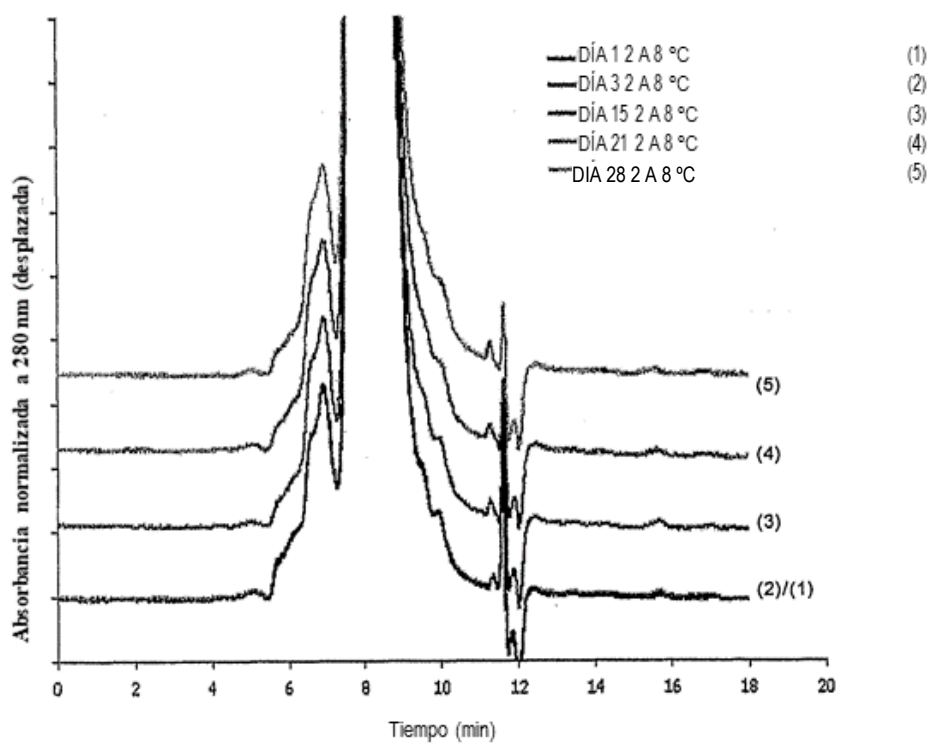


FIGURA 5: ampliación de los cromatogramas del análisis GP-HPLC de 28 días para los eluatos almacenados a 25 °C.

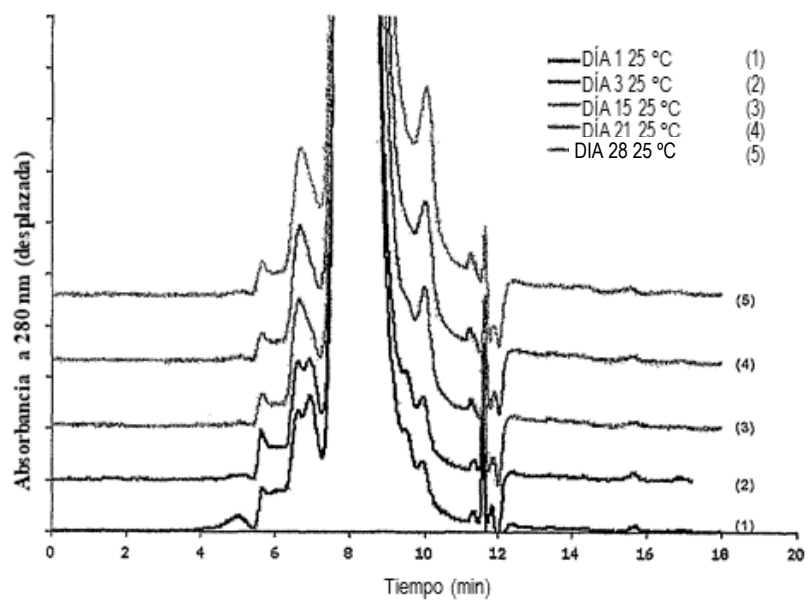


FIGURA 6: ampliación de los cromatogramas del análisis GP-HPLC de 28 días para los eluatos neutralizados con hidróxido de sodio 100 mM o 50 mM,

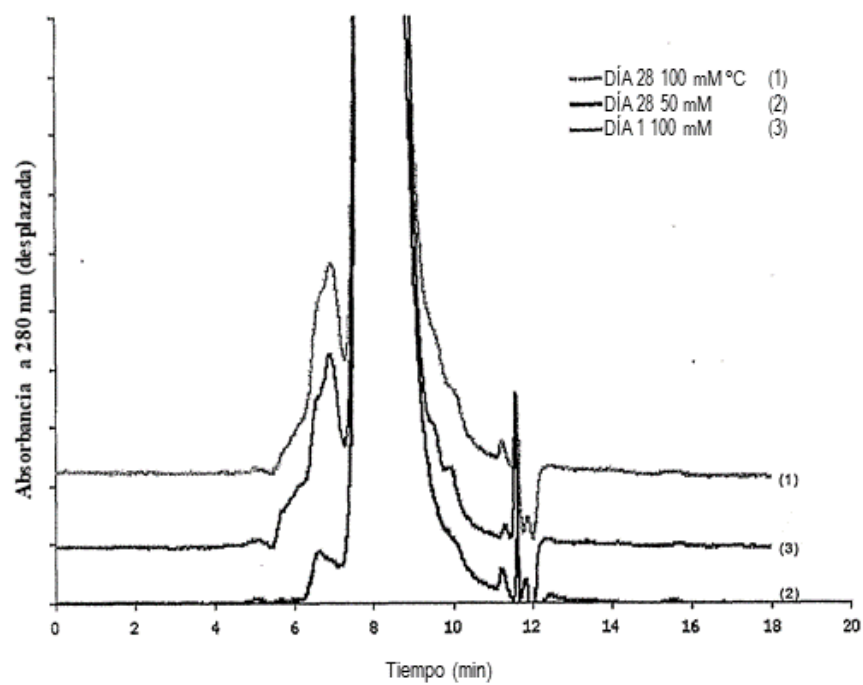


FIGURA 7: análisis IEF de 28 días para el Día veintiocho

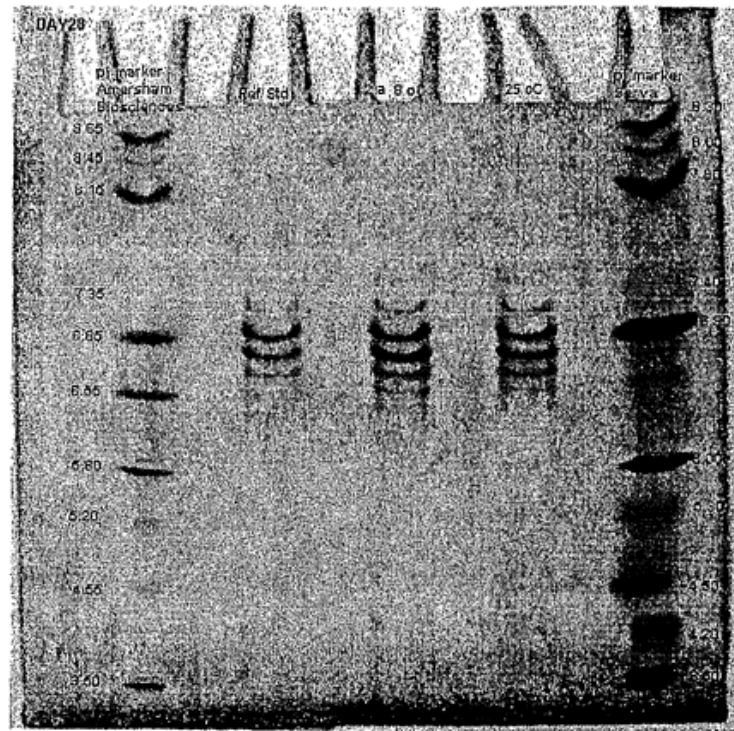


FIGURA 8: análisis HPLC de la filtración en gel de 12 meses cuando se almacena a -70° C

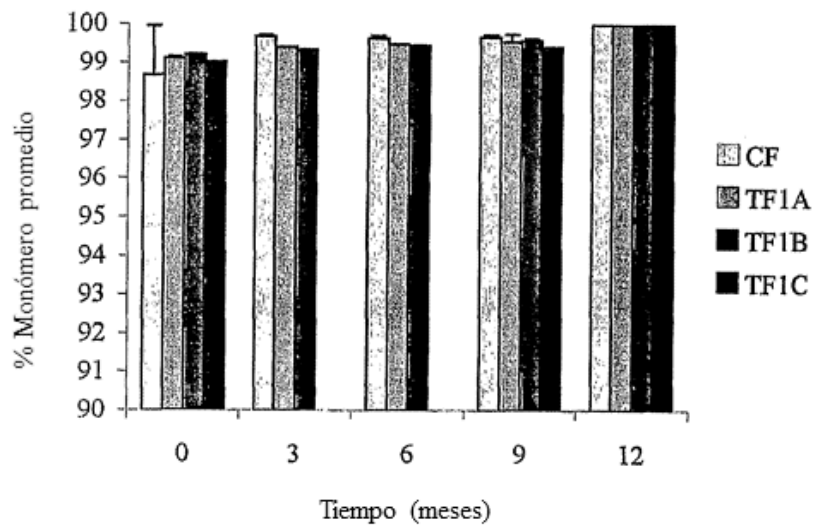


FIGURA 9: análisis HPLC de la filtración en gel de 12 meses cuando se almacena a +5° C

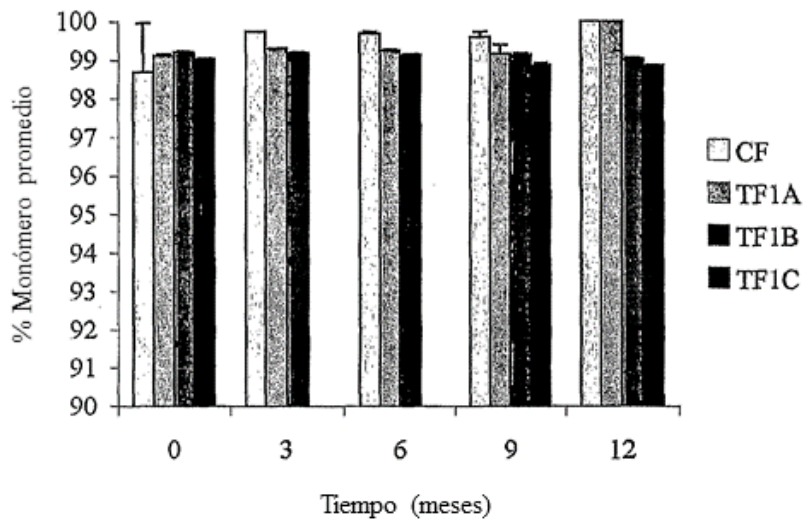


FIGURA 10: análisis HPLC de la filtración en gel de 12 meses cuando se almacena a +25° C

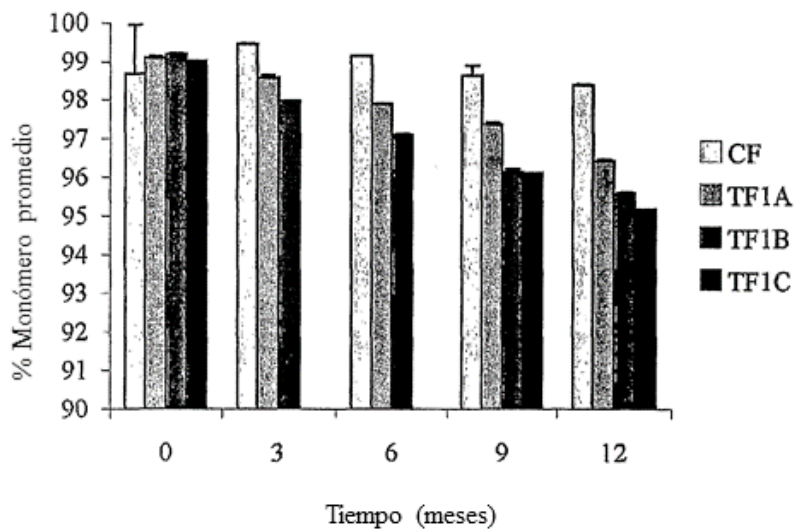


FIGURA 11: análisis HPLC de la filtración en gel de 8 semanas cuando se almacena a +37° C

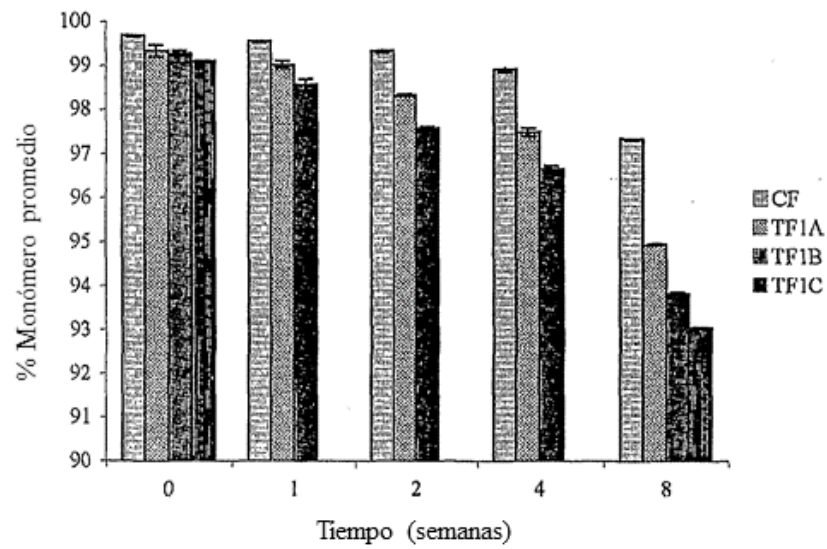


FIGURA 12: análisis HPLC de la filtración en gel de 5 días cuando se almacena a +45° C

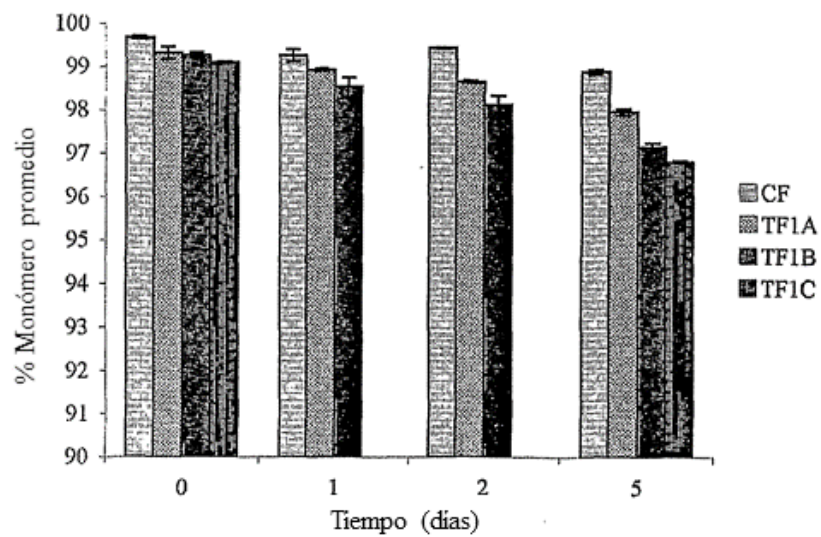


FIGURA 13: análisis SDS-PAGE reducido de las muestras a 0, 6 y 12 meses cuando se almacena a -70°C

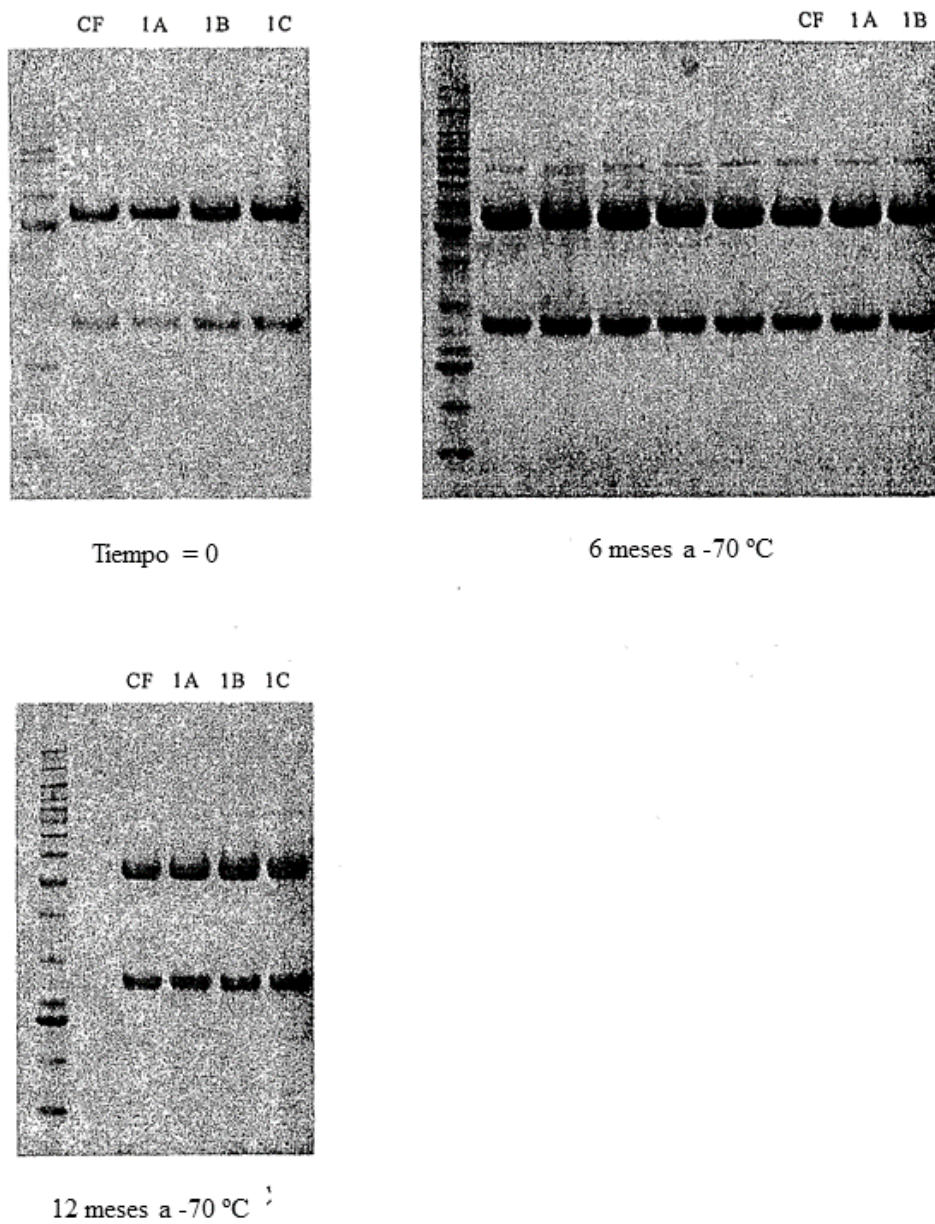


FIGURA 14: porcentaje de abundancia de las cadenas ligera y pesada de BAK502G9 después de un análisis SDS-PAGE reducido cuando se almacena a -70°C

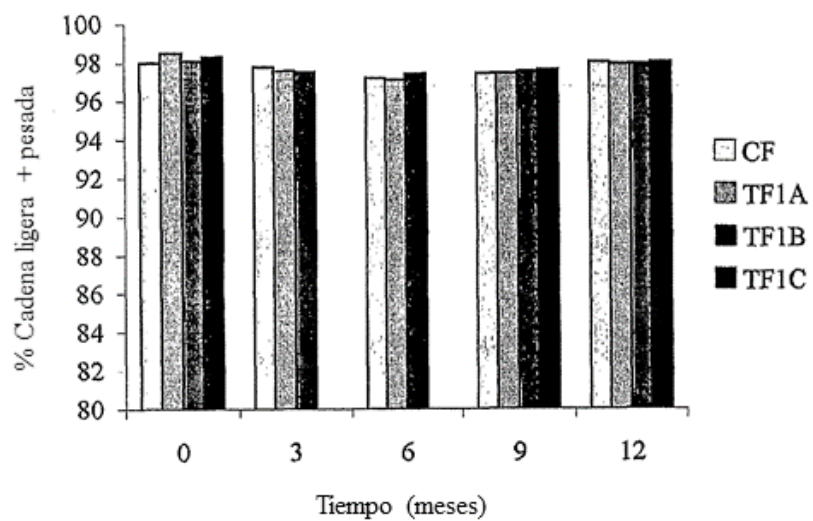


FIGURA 15: análisis SDS-PAGE reducido de las muestras a 0, 6 y 12 meses cuando se almacena a +5° C

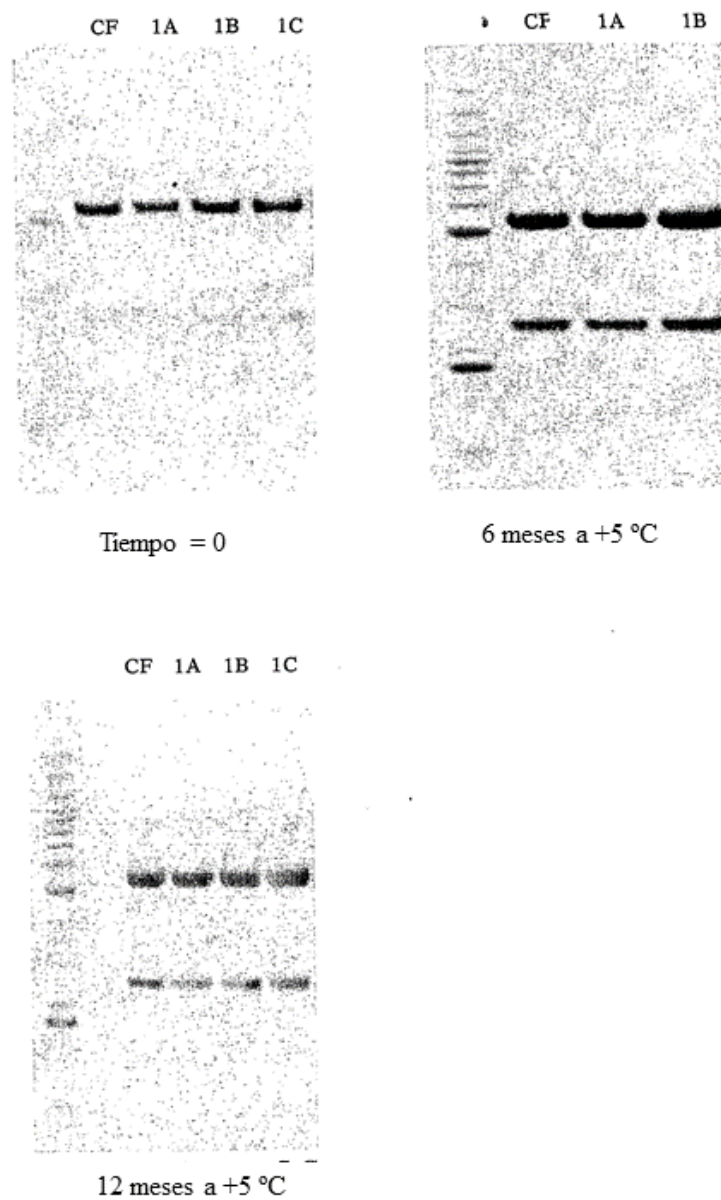


FIGURA 16: porcentaje de abundancia de las cadenas ligera y pesada de BAK502G9 después de un análisis SDS-PAGE reducido cuando se almacena a +5° C

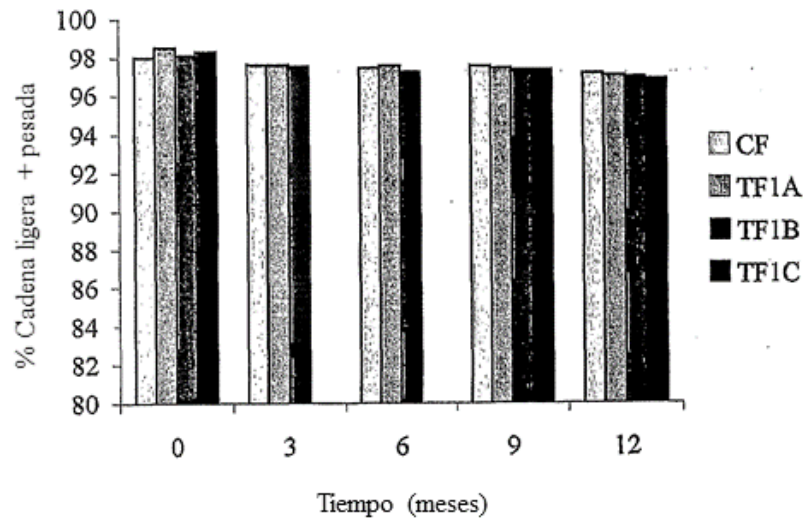


FIGURA 17: análisis SDS-PAGE reducido de las muestras a 0, 6 y 12 meses cuando se almacena a +25° C

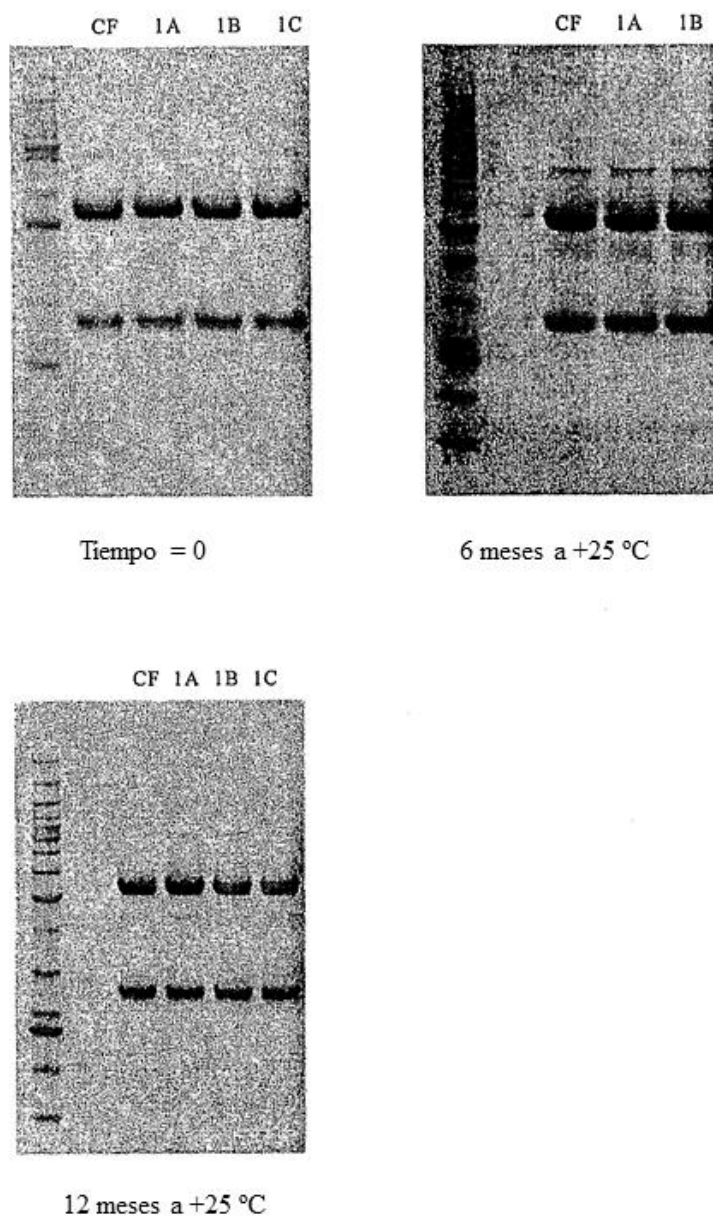


FIGURA 18: porcentaje de abundancia de las cadenas ligera y pesada de BAK502G9 después de un análisis SDS-PAGE reducido cuando se almacena a +25° C

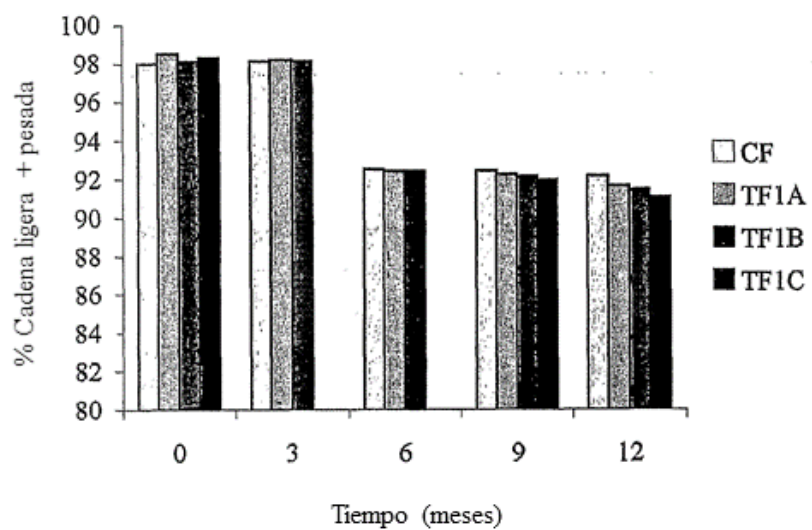


FIGURA 19: análisis SDS-PAGE reducido de las muestras a 0 y 8 semanas cuando se almacena a +37° C

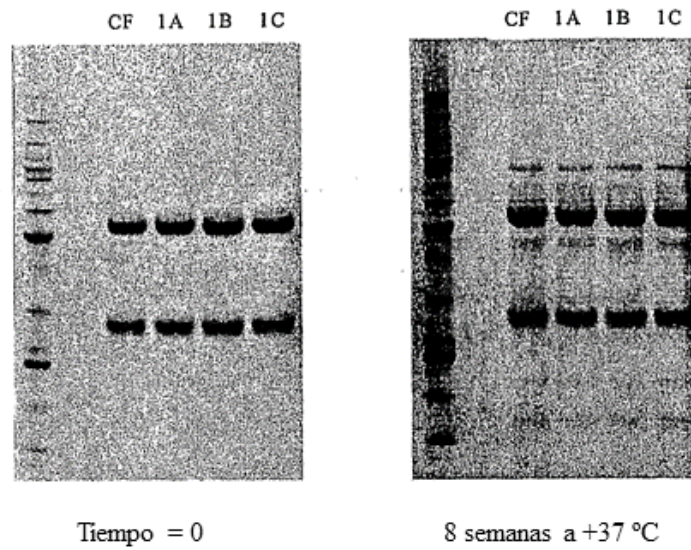


FIGURA 20: porcentaje de abundancia de las cadenas ligera y pesada de BAK502G9 después de un análisis SDS-PAGE reducido cuando se almacena a +37° C

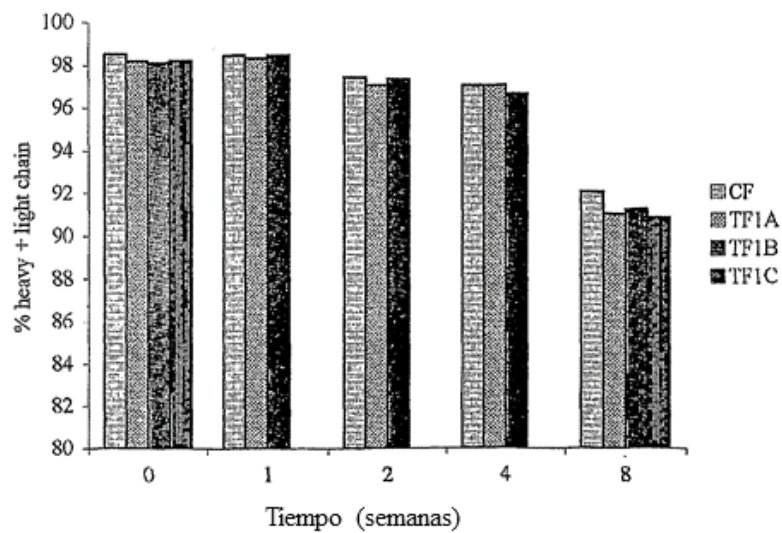


FIGURA 21: análisis SDS-PAGE reducido de las muestras a 0 y 5 días cuando se almacena a +45° C

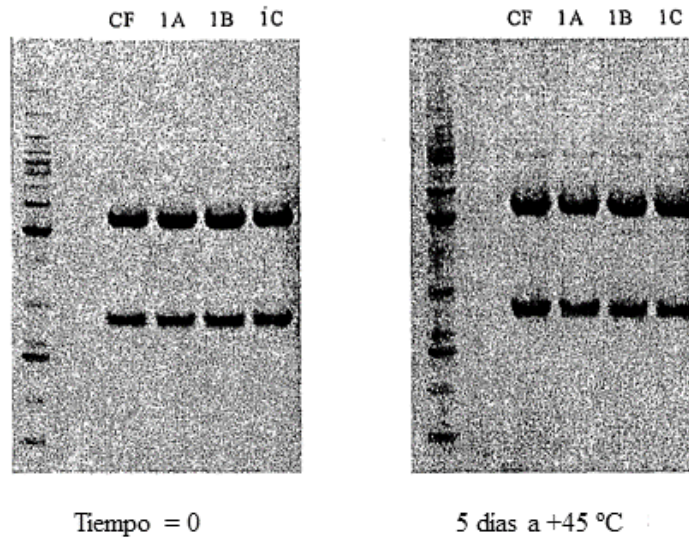


FIGURA 22: porcentaje de abundancia de las cadenas ligera y pesada de BAK502G9 después de un análisis SDS-PAGE reducido cuando se almacena a +45° C

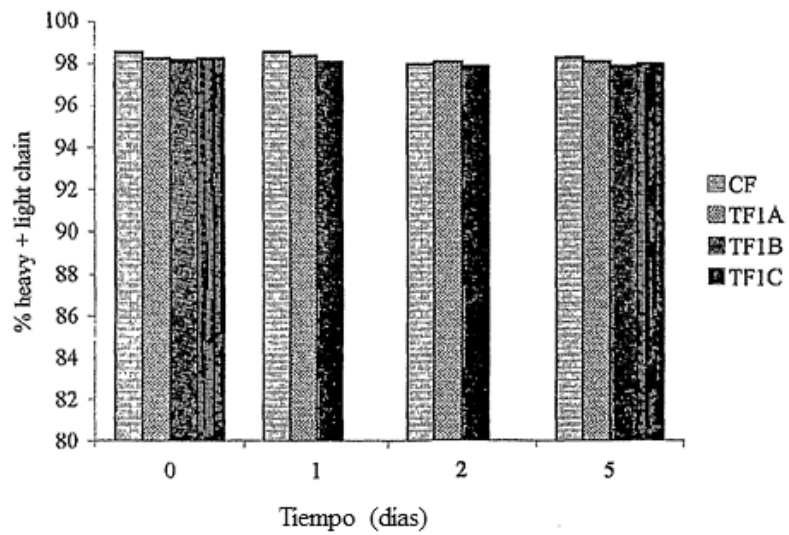


FIGURA 23: análisis SDS-PAGE no reducido de las muestras a 0, 6 y 12 meses cuando se almacena a -70 °C

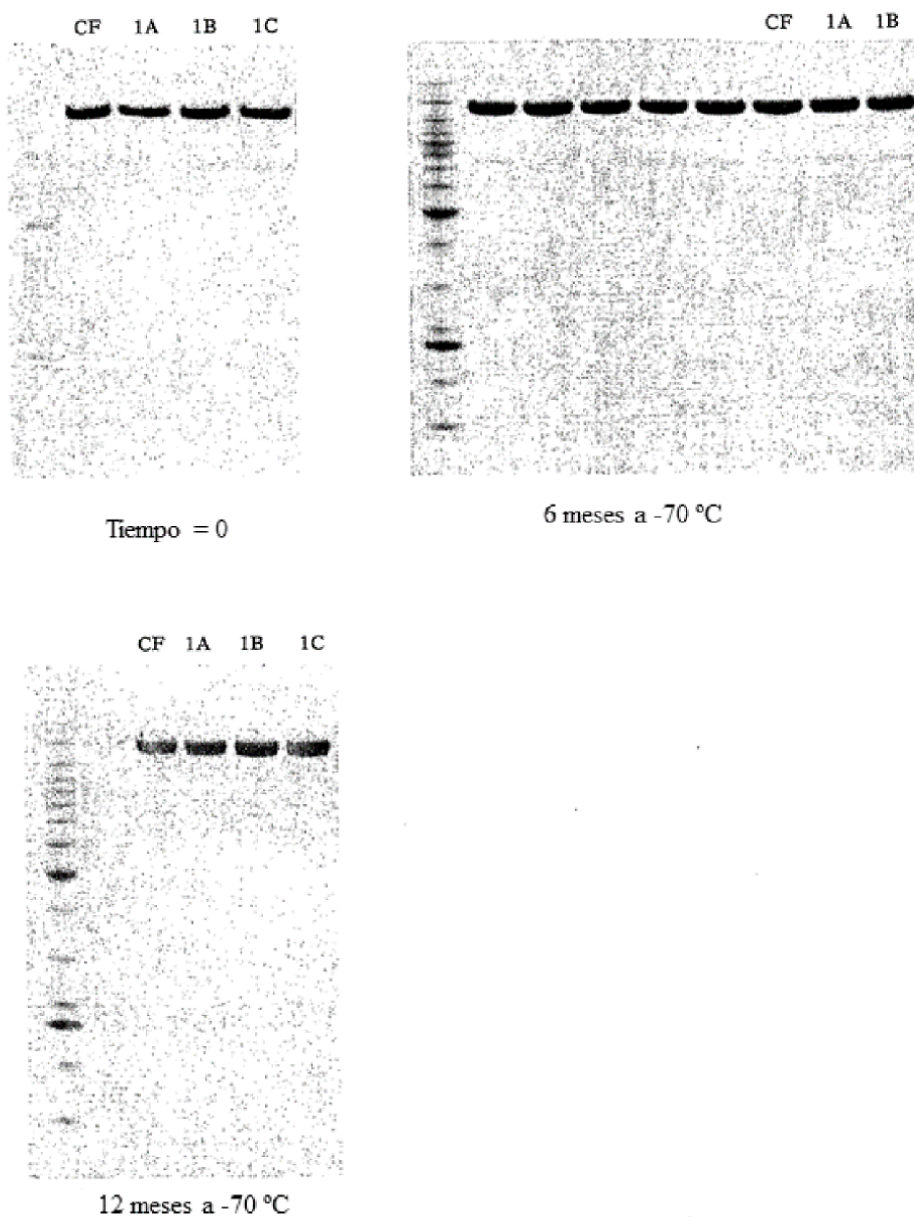


FIGURA 24: porcentaje de abundancia del monómero de BAK502G9 intacto después de un análisis SDS-PAGE no reducido cuando se almacena a -70° C

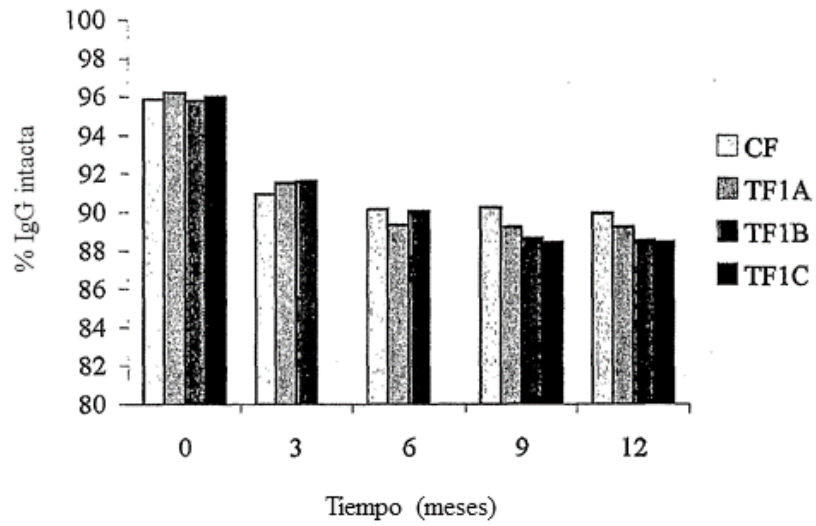


FIGURA 25: análisis SDS-PAGE no reducido de las muestras a 0, 6 y 12 meses cuando se almacena a +5 °C

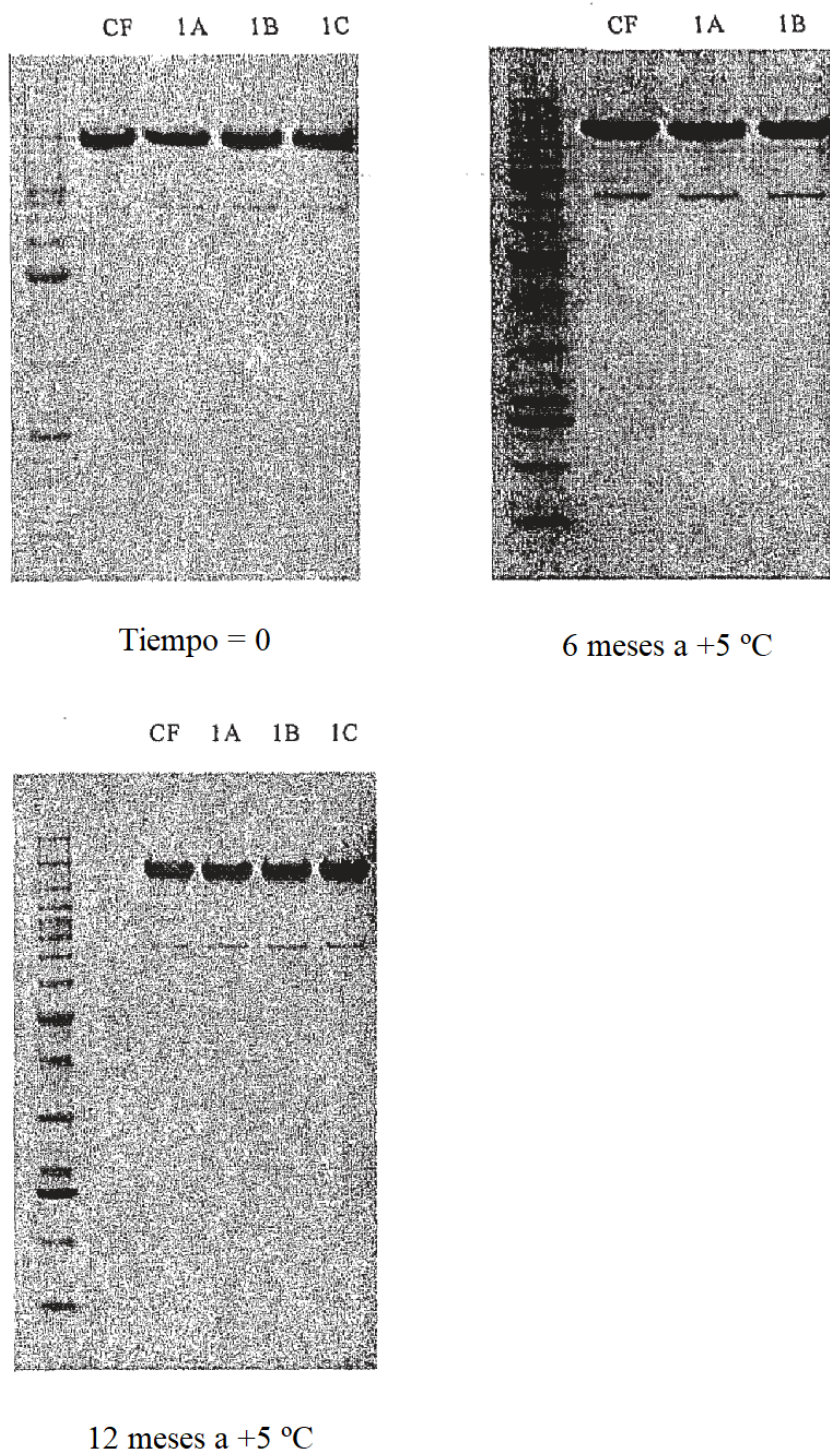


FIGURA 26: porcentaje de abundancia del monómero de BAK502G9 intacto después de un análisis SDS-PAGE no reducido cuando se almacena a +5° C

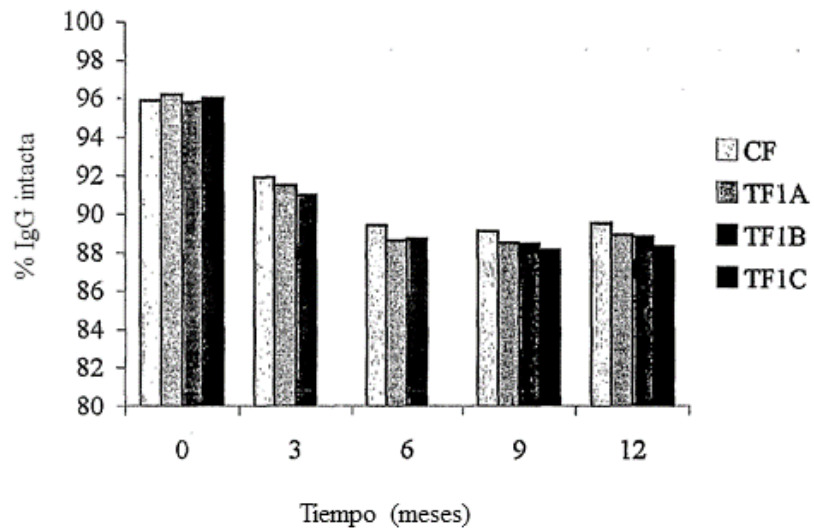


FIGURA 27: análisis SDS-PAGE no reducido de las muestras a 0, 6 y 12 meses cuando se almacena a +25° C

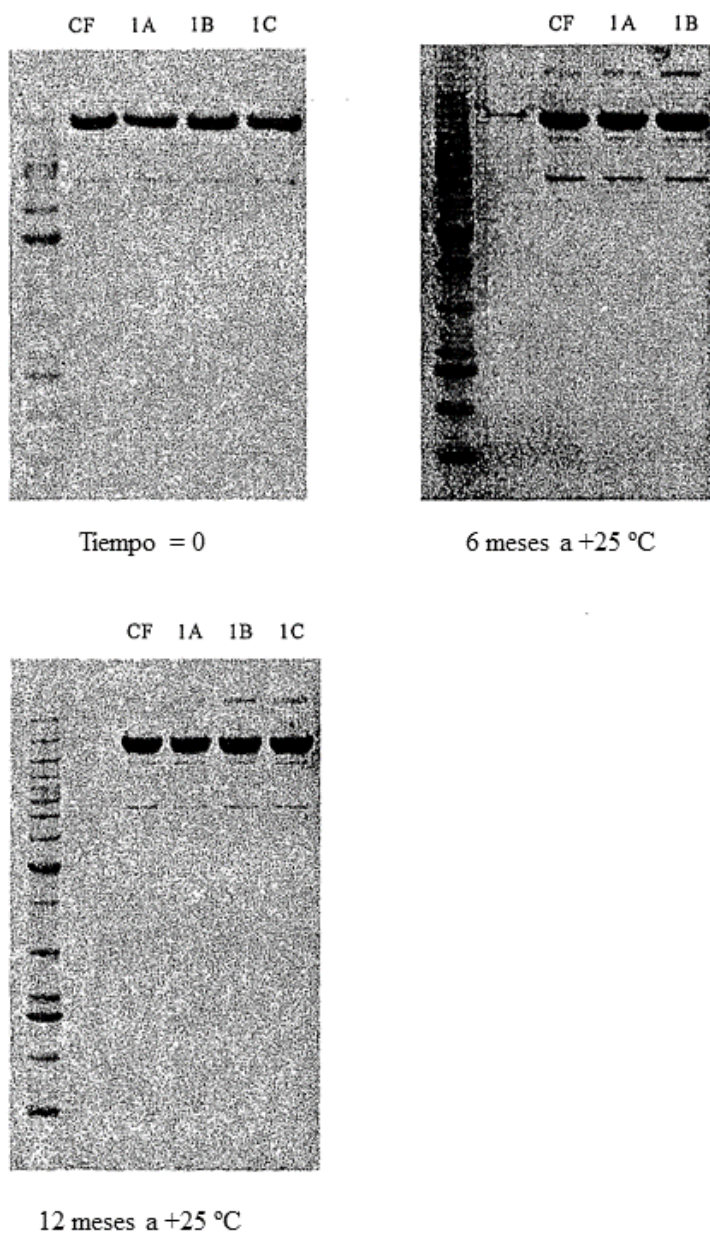


FIGURA 28: porcentaje de abundancia del monómero de BAK502G9 intacto después de un análisis SDS-PAGE no reducido cuando se almacena a +25° C

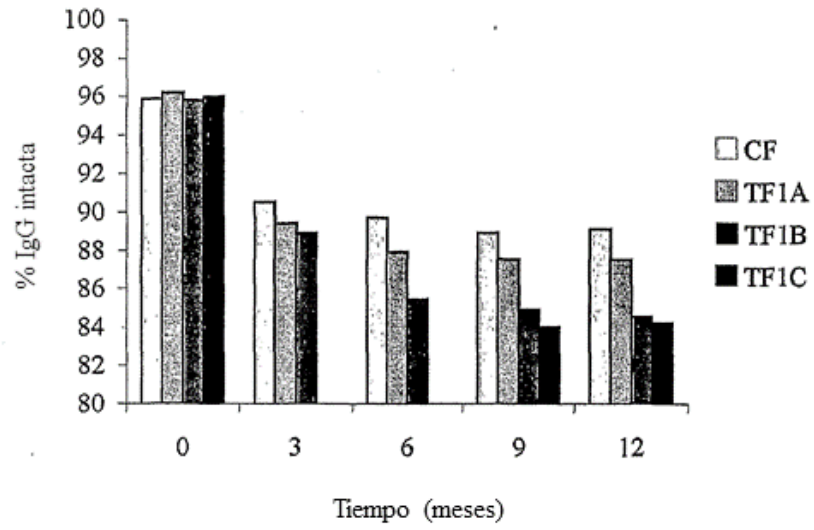


FIGURA 29: análisis SDS-PAGE no reducido de las muestras a 0 y 8 semanas cuando se almacena a +37° C

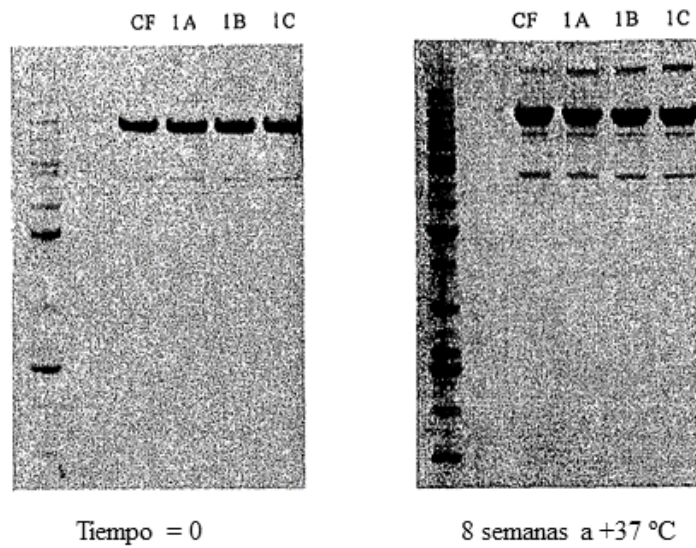


FIGURA 30: porcentaje de abundancia del monómero de BAK502G9 intacto después de un análisis SDS-PAGE no reducido cuando se almacena a +37° C

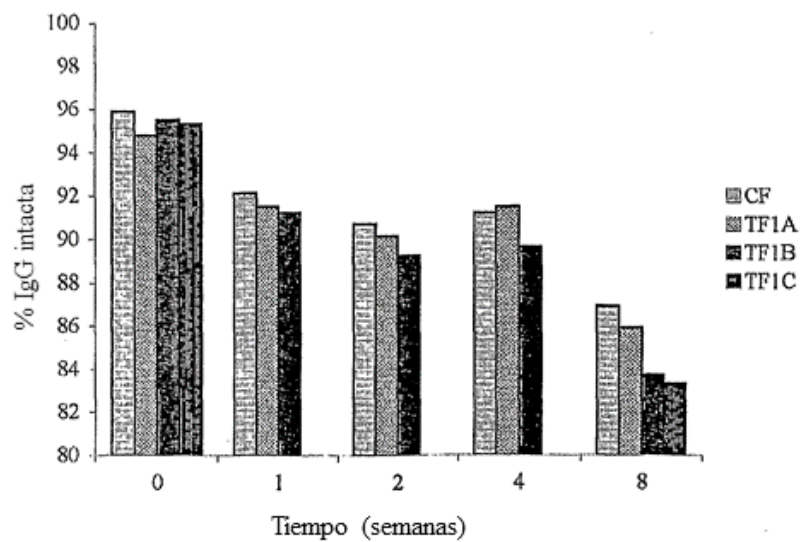


FIGURA 31: análisis SDS-PAGE no reducido de las muestras a 0 y 5 días cuando se almacena a +45° C

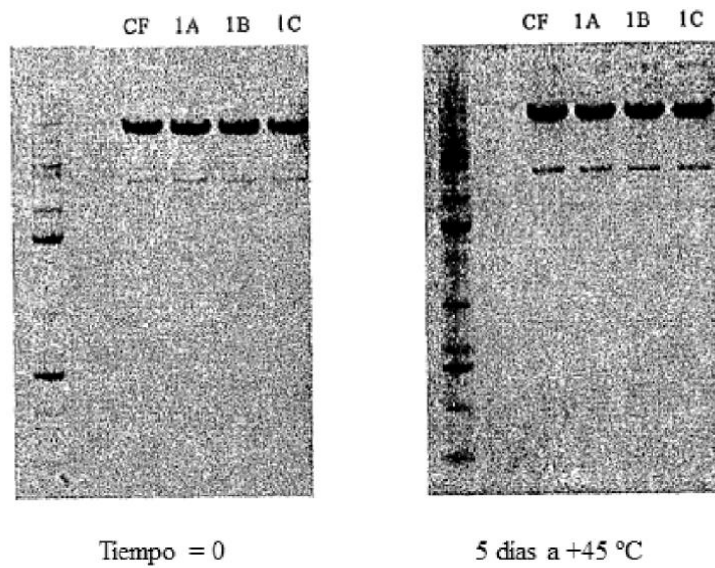


FIGURA 32: porcentaje de abundancia del monómero de BAK502G9 intacto después de un análisis SDS-PAGE no reducido cuando se almacena a +45° C

