

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 716**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2014 PCT/EP2014/066646**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015 WO15015001**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2014 E 14755788 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 3028041**

54 Título: **Método in vitro para determinar la estabilidad de composiciones que comprenden receptor(es) de Fc gamma soluble(s)**

30 Prioridad:

01.08.2013 EP 13003835

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

26.10.2018

73 Titular/es:

**SUPREMOL GMBH (100.0%)
Am Klopferspitz 19a
82152 Martinsried, DE**

72 Inventor/es:

**SONDERMANN, PETER;
POHL, THOMAS y
TER MEER, DOMINIK**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 687 716 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

Método *in vitro* para determinar la estabilidad de composiciones que comprenden receptor(es) de Fc gamma soluble(s)

5 La presente invención se refiere, básicamente, a un método *in vitro* para determinar la estabilidad de una composición que comprende o consiste esencialmente en receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB, comprendiendo dicho método las etapas de poner en contacto una superficie que comprende receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB con una cantidad establecida de IgG humana agregada; poner en contacto
10 dicha superficie que comprende receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB con una cantidad establecida de dicha composición de receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB; determinar la cantidad de IgG humana agregada que se une a dicha superficie que comprende dicho receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB, y comparar la cantidad de IgG humana agregada que se une a dicha superficie tal como se determina en la etapa (c) con un valor de referencia y determinar (de ese modo) la estabilidad de dicha composición que comprende
15 o consiste esencialmente en receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB. La presente invención también se refiere a IgG humana agregada obtenible mediante un método tal como se define en el presente documento, así como al uso de la IgG humana agregada mencionada en los métodos de la invención.

20 Los receptores de Fc (FcR) desempeñan un papel fundamental en el sistema inmunitario en el que controlan el grado y la fuerza de una respuesta inmunitaria. Después de que los patógenos hayan accedido a la circulación sanguínea, los opsonizan inmunoglobulinas (Ig). Los inmunocomplejos (IC) resultantes se unen debido a su multivalencia con gran avidez a células que portan FcR conduciendo a la agrupación de los FcR, lo que desencadena varias funciones efectoras (Metzger, H., J. Immunol. 1992, 149:1477-1487). Estas incluyen, según el tipo de FcR expresado y las proteínas asociadas, endocitosis con posterior neutralización de los patógenos y
25 presentación de antígenos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), secreción de mediadores o la regulación de la producción de anticuerpos (Fridman *et al*, Immunol. Rev. 1992, 125:49-76; van de Winkel y Capel, Immunol. Today 1993, 14:215-221).

30 Los inmunocomplejos se derivan de interacciones complejas entre anticuerpo, antígenos, complemento y diversos receptores como parte de la inmunidad adaptativa. Los antígenos unidos a anticuerpos en inmunocomplejos se retiran normalmente mediante diversos mecanismos celulares fisiológicamente capaces de eliminar incluso pequeñas cantidades de antígenos "foráneos" de la circulación. Pueden formarse inmunocomplejos cuando los humanos se exponen a sustancias foráneas como proteínas (infecciones, vacunas, fármacos, etc.) o materiales no proteicos (haptenos) que necesitan un portador proteico para activar la cascada. Los trastornos autoinmunitarios se desarrollan cuando se depositan inmunocomplejos (patógenos) patológicamente en diferentes órganos, iniciando
35 cascadas inflamatorias que conducen a enfermedad/daño orgánico. La enfermedad por inmunocomplejos puede manifestarse en una infinidad de formas cuando se produce desregulación en uno o más de estos componentes.

40 Existen FcR específicos para todas las clases de inmunoglobulina (Ig). Puesto que IgG es el isotipo de anticuerpo más abundante encontrado en la circulación humana, se deduce que los FcR para IgG, receptores de Fc gamma (Fc γ R), son los más abundantes con la mayor diversidad. Se encuentran proteínas ortólogas correspondientes a los Fc γ R humanos en otras especies de mamífero, incluyendo otros primates tales como monos y ratones. Como los humanos, otras especies tienen varios Fc γ R con afinidad variable por sus subclases de IgG correspondientes. Los Fc γ R comprenden tanto receptores activantes como inhibidores, y esta integración de señales positivas y negativas es necesaria para una respuesta inmunitaria productiva.
45

Existen tres clases de Fc γ R en humanos: el receptor de alta afinidad Fc γ RI y los receptores de baja afinidad Fc γ RII y Fc γ RIII. Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIIIA (CD16) se producen como proteínas transmembrana de tipo I o en formas solubles (sFcR), pero también existe una forma anclada a glicosilfosfatidilinositol del Fc γ RIII (Fc γ RIIIb).
50 Además, se producen Fc γ R en diversas isoformas (Fc γ RIA, B1, B2, C; Fc γ RIIA1-2, B1-3, C) y alelos (Fc γ RIIA1-HR, -LR; Fc γ RIIIb-NA1, -NA2) (van de Winkel y Capel, Immunol. Today 1993, 14:215-221). Tal como se mencionó anteriormente, estos Fc γ R tienen diferente afinidad por IgG y específicamente diferente afinidad de unión a las diferentes subclases de IgG. Hay cuatro subclases de IgG en humanos, nombradas en orden de abundancia en el suero (IgG1 (66%), 2 (23%), 3 (7%) y 4 (4%); Hashira *et al.*, Pediatr. Int. 2000, 42(4):337-342).
55

Fc γ RII es el receptor con la distribución más amplia en células inmunocompetentes y, junto con Fc γ RIIIA, está implicado principalmente en la endocitosis de inmunocomplejos. Fc γ RII existe en tres isoformas, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIC; sin embargo, la región extracelular de Fc γ RIIB y Fc γ RIIC es idéntica, mientras que Fc γ RIIA difiere en su región extracelular en sólo el 7% de los residuos de aminoácido. No obstante, ambas formas pueden distinguirse por sus características de unión a subclases de IgG humanas y de ratón (van de Winkel y Capel, Immunol. Today 1993, 14:215-221) y su afinidad diferente por IgG humanas (Bruhns *et al.*, Blood 2009, 113:3716-3725). Fc γ RIIIA es el receptor clave para la inducción de ADCC, mientras que el Fc γ RIIB inhibidor representa el único Fc γ R que se expresa en células B. En ellas, la expresión de Fc γ RIIB es fundamental para la regulación por disminución de células B que da como resultado una reducción de la producción de anticuerpos.
60
65

Basándose en sFc γ R IIB, los inventores están desarrollando medios y métodos nuevos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. El producto más avanzado es SM101, que compite con Fc γ R expresados en células inmunitarias por la unión de inmunocomplejos patógenos. SM101 participa actualmente en ensayos clínicos en los EE.UU. y Europa para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios tales como lupus eritematoso y trombocitopenia inmunitaria.

Se supone que los medicamentos proteínicos, por ejemplo, un medicamento o composición farmacéutica que comprende SM101, pueden degradarse durante el almacenamiento y, por tanto, es muy deseable desarrollar pruebas *in vitro* reproducibles que reflejen la actividad residual de tales proteínas o composiciones que las comprenden.

Por tanto, el problema técnico de la presente invención era desarrollar un método *in vitro* para determinar la estabilidad de composiciones que comprenden Fc γ R humanos solubles.

Los presentes inventores observaron que preparaciones de IgG humana obtenidas de un conjunto de personas "normales" o "sanas" (por ejemplo, preparaciones comercialmente disponibles de inmunoglobulina intravenosa (IVIG)) comprendían una fracción hasta ahora no identificada de IgG humana agregada que puede proporcionarse de manera normalizada y fiable. Esto es sorprendente, puesto que no se sabía anteriormente que tales análogos de inmunocomplejos patógenos podían derivarse a partir de un conjunto por lo demás "normal" o "sano" de seres humanos. Dicha IgG humana agregada se une a receptores de Fc γ R e imita de ese modo la situación *in vivo* (es decir, imita los inmunocomplejos patógenos mencionados anteriormente) y, por tanto, puede usarse en métodos que pretenden detectar, determinar o verificar la estabilidad de composiciones que comprenden receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB. De manera notable, la IgG humana agregada no se agrega por calor tal como, por ejemplo, se describe en Engelhard, *et al.*, (1990), Eur. J. Immunol. 20, 1367-1377, Bruhns *et al.* (2009), Blood J. 113(16), 3716-3725 o el documento US 2008/008700. Bruhns *et al.* describen IgG humana agregada por calor (página 3718, Ensayos de unión a inmunoglobulinas), que se genera mediante incubación de IgG humana en una solución salina tamponada con borato a pH 8,0 y 63°C durante 30 minutos sin ningún tratamiento posterior e inmunocomplejos artificiales derivados de BSA químicamente modificada (NIP12-BSA-biotina) en complejo con AcM anti-NIP purificados de sobrenadantes de cultivos celulares (página 3717, Anticuerpos y reactivos). Del mismo modo, el documento US 2008/008700 divulga el uso de HAGG (IgG agregada por calor) en la página 8, [0093].

La presente invención se refiere por consiguiente a un método *in vitro* para determinar la estabilidad (tal como la estabilidad en anaquel o estabilidad en almacenamiento) de una composición, preferiblemente de una composición farmacéutica (que se equipara con un medicamento), composición que comprende o consiste esencialmente en receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner en contacto una superficie que comprende receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB con una cantidad establecida de IgG humana agregada;

(b) poner en contacto dicha superficie que comprende receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB con una cantidad establecida de dicha composición de receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB; y

(c) determinar la cantidad de IgG humana agregada que se une a dicha superficie que comprende dicho receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB,

(d) y comparar la cantidad de IgG humana agregada que se une a dicha superficie tal como se determina en la etapa (c) con un valor de referencia y determinar (de ese modo) la estabilidad tal como la estabilidad en anaquel; estabilidad a lo largo del tiempo; vida útil de dicha composición que comprende o consiste esencialmente en receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB.

Las etapas (a) y (b) de los métodos de la invención pueden llevarse a cabo de manera concomitante o consecutiva. También se prevé que el orden de las etapas (b) y (a) se invierta.

Se prevé que los métodos de la invención comprendan una etapa de lavado que va a llevarse a cabo antes de la etapa (c) y preferiblemente después de la etapa (a) y (b).

Se prefiere que dicho receptor de Fc gamma humano soluble que se emplea en el contexto de la presente invención sea un receptor IIB de Fc gamma humano soluble. Se prefiere particularmente que dicho receptor IIB de Fc gamma humano soluble sea SM101 (SEQ ID NO. 1), incluyendo preparaciones de estos receptores que pueden obtenerse por medio de la expresión de estos receptores en células huésped, tales como, por ejemplo, células de mamífero o células bacterianas como *E. coli*.

La presente invención se refiere asimismo al uso de la IgG humana agregada que se define en el presente documento, en los métodos y realizaciones de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, el término "método *in vitro*" se refiere a un método que se realiza fuera del

cuerpo del humano o del animal, en contraste con un método *in vivo*.

La palabra “método” puede sustituirse por “prueba” o “ensayo” o similares.

5 El término “estabilidad” comprende la “estabilidad en anaquel” o “vida útil” o “semivida”. La “estabilidad” de una composición se refiere, básicamente, a la estabilidad del componente principal contenido en la misma, es decir, la estabilidad del receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB definido en el presente documento. Dicha estabilidad puede verse afectada por diferentes parámetros, tales como el tiempo, es decir, “estabilidad a lo largo del tiempo”; temperatura, condiciones de tampón, huésped de producción del receptor de Fc gamma humano soluble
10 IIA, IIB, IIIA y/o IIIB; secuencia del receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB; método de fabricación del receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB, etc.

Al determinar la estabilidad de la composición de la invención (que comprende o consiste esencialmente en receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB) es asimismo posible monitorizar/controlar la calidad/condición/capacidad de unión de dicha composición (es decir, básicamente, del componente principal de dicha composición que es el receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB).
15

La “composición” es, en una realización preferida, una composición farmacéutica (que se equipara con un medicamento) o una composición de diagnóstico, y puede comprender adicionalmente portadores, tampones, componentes farmacéutica o diagnósticamente aceptables, etc. Dicha composición también puede comprender además principios terapéuticamente activos.
20

El término “IgG humana agregada” (a veces también denominada “IgG agregada humana” o similar) se refiere a la porción agregada de una preparación de IgG humana. Tales preparaciones están presentes sorprendentemente en productos a base de sangre (tales como preparaciones de IgG humana agrupada o IVIG) que pueden usarse para administración intravenosa o subcutánea o muscular, productos que contienen IgG agrupada (preferiblemente polivalente). Por tanto, la IgG humana agregada puede obtenerse/aislarse preferiblemente o puede obtenerse de preparaciones de IgG humana agrupada, tales como preparaciones/composiciones de IVIG. Se prevé que dicha IgG humana agregada sea una IgG humana agregada que puede aislarse de “proteína humana” que se caracteriza por un contenido de al menos el 90% de IgG humana. Dicha proteína humana deriva/puede derivarse de suero o plasma humano y, en una realización preferida, se caracteriza o se identifica como inmunoglobulina humana normal (IgG humana) con el código de ATC J06BA01 o J06BA02 según el sistema de clasificación anatómica, terapéutica y química (ATC) del Centro colaborador de la OMS para Metodología estadística de fármacos (WHOC). El término “proteína humana” cuando se usa en el presente documento incluye preparaciones de IgG humana agrupada. En una realización preferida, la IgG humana comprende al menos el 50% de IgG del subtipo IgG1. En una realización más preferida, la IgG humana comprende (además) al menos el 20% de IgG del subtipo IgG2. En una realización particularmente preferida, dicha IgG humana agregada se obtiene/se aísla o puede obtenerse de Beriglobin®, Varitect® o Venbig®, prefiriéndose Beriglobin. Beriglobin comprende el 95% o más, tal como el 100%, de IgG. Por ejemplo, Beriglobin que contiene el 100% de IgG puede comprender el 61% de IgG1, el 28% de IgG2, el 5% de IgG3, el 6% de IgG4 y puede, como máximo, comprender aproximadamente el 1% de IgA. Los valores en porcentaje indicados para Beriglobin, Varitect y Vendig se refieren a % (p/p). Un ejemplo de Beriglobin es aquel con el número de lote 26840311A o 23840311B. Varitect comprende el 95% o más, tal como el 100%, de IgG. Por ejemplo, Varitect del 100% de IgG puede comprender el 59% de IgG1, el 36% de IgG2, el 3% de IgG3, el 2% de IgG4, y puede comprender el 5% o menos de IgA. Venbig comprende el 95% o más, tal como el 100%, de IgG. Por ejemplo, Vendig del 100% de IgG puede comprender el 52-80% de IgG1, el 26-50% de IgG2, el 2,4-5% de IgG3, el 0,3-1% de IgG4. Por supuesto, el experto puede aplicar Beriglobin, Varitect, Vendig o cualquier otra composición similar a estos tres medicamentos en los métodos y usos de la presente invención. Otra IgG humana agregada preferida se obtiene/se aísla o puede obtenerse de Subcuvia®. Por ejemplo, Subcuvia del 100% de IgG puede comprender el 45-75% de IgG1, el 20-45% de IgG2, el 3-10% de IgG3, el 2-8% de IgG4. Los valores en porcentaje indicados para Subcuvia se refieren a % (p/p). Un ejemplo de Subcuvia es aquel con el número de lote BVNG1M032A.
25
30
35
40
45
50

Sin embargo, el experto no sólo puede usar estos tres medicamentos, sino que también puede preparar una preparación de IgG humana por sí mismo. Efectivamente, el experto está fácilmente en condiciones de preparar una preparación de IgG tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, agrupando IgG de plasma de al menos 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o más, preferiblemente 1000 o más donantes humanos, obteniendo de ese modo una preparación de IgG humana (agrupada). Como resultado, una preparación de IgG humana tal como se aplica en la presente invención comprende preferiblemente el 95% o más, tal como el 100% de IgG. Una preparación de IgG tal como se aplica en el presente documento comprende preferiblemente subclases de IgG tal como sigue: el 52-80% (p/p) de IgG1, el 26-50% (p/p) de IgG2, el 2-5% (p/p) de IgG3 y/o el 0,2-6% (p/p) de IgG4, con la condición de que el contenido de IgG total no supere el 100% (p/p).
55
60

En una realización adicional preferida, dicha proteína humana consiste en o comprende suero o plasma mezclado de al menos 100, es decir 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, etc. donantes humanos (sanos o “convencionales”), que comprende los cuatro subgrupos de IgG. Se prefiere suero o plasma mezclado de al menos 500 donantes humanos (sanos o “convencionales”). El término “sano” significa un individuo que cumple los criterios de elegibilidad convenciones actuales (en el momento de la donación) para donar sangre, teniendo en cuenta que
65

tales criterios de elegibilidad están sujetos a mejora y cambio continuos.

En otra realización, se prevé que dicha IgG humana agregada sea una IgG humana agregada que puede obtenerse a partir de dicha proteína humana mediante un método de aislamiento que comprende cromatografía de exclusión molecular. En una realización preferida, dicha cromatografía de exclusión molecular separa IgG monomérica y/o dimérica de dicha IgG humana agregada. Se divulgan medios y métodos para aislar la IgG humana agregada que pueden usarse en el contexto de la presente invención en el presente documento en otra parte (por ejemplo, en los ejemplos). También se prevé que la IgG humana agregada de la presente invención no sea IgG humana agregada por calor como, por ejemplo, la descrita en Engelhard, *et al.*, (1990), Eur. J. Immunol. 20, 1367-1377, Bruhns *et al.* (2009), Blood J. 113(16), 3716-3725 o el documento US 2008/008700. Efectivamente, la IgG agregada por calor diferirá de la IgG agregada que se obtiene/puede obtenerse tal como se describe en el presente documento. Concretamente, la agregación por calor es un resultado de la desnaturalización parcial de proteínas cuando se aplican temperaturas por encima de la temperatura de fusión (Tf) a una proteína dada. La temperatura de fusión es una función de la proteína y, en caso de una mezcla de IgG humanas, se observará necesariamente un amplio intervalo de Tf. Por tanto, el grado de agregación variará entre un lote y otro según la mezcla de IgG usada.

Además, varias IgG monoméricas serán inevitablemente parte de la preparación de IgG agregada por calor y, por tanto, no permitirían que una preparación de IgG agregada sin cantidades variables de IgG monomérica se considere que son impurezas. Sin embargo, los métodos para la preparación de IgG agregada tal como se describe en el presente documento separan IgG monomérica y/o dimérica de IgG agregada y, por tanto, la IgG agregada resultante tal como se obtiene/puede obtenerse mediante los métodos descritos en el presente documento es diferente de la IgG agregada por calor de la técnica anterior.

Por tanto, es evidente que la IgG agregada por calor no es comparable con las preparaciones de IgG agregada tal como se divulga mediante la presente invención, que ofrecen estabilidad a largo plazo y son perfectamente adecuadas para pruebas de liberación de lotes u otras pruebas de rutina.

Se prevé que las preparaciones de IgG humana agrupada tales como preparaciones de inmunoglobulina intravenosa (IVIG), a veces también denominada inmunoglobulina plasmática para administración intravenosa, se deriven de plasma agrupado de cientos de donantes sanos y contengan tanto anticuerpos inmunitarios como naturales (AcN) que reflejan la experiencia de antígenos acumulada de la población donante. Una preparación de IgG humana agrupada es, por su naturaleza, muy policlonal y contiene muchas especies de anticuerpo. Por tanto, contiene un gran espectro de los denominados "anticuerpos inmunitarios" con especificidades dirigidas contra patógenos y antígenos foráneos, así como AcN que reaccionan con una amplia gama de antígenos incluyendo autoantígenos. Los AcN se definen así puesto que se generan en ausencia de inmunización deliberada e independientemente de la exposición a antígenos foráneos.

Además de preparaciones intravenosas, hay preparaciones diseñadas para administración subcutánea (SCIG) e intramuscular (IMIG). Tal como se usa en el presente documento, el término "IVIG" pretende abarcar preparaciones de IVIG, SCIG e IMIG. Las formulaciones de IVIG se conocen bien e incluyen INTRAGAM® P, PRIVIGEN®, HIZENTRA®, Gamunex®, Flebogamma®, Octagam® y Gamimune®.

Una característica compartida por la preparaciones de IgG humana agrupada, tales como preparaciones de IVIG, es que se derivan de plasma o suero normal y que las principales especies de inmunoglobulina que contienen es IgG, por ejemplo, al menos el 98% de la inmunoglobulina en INTRAGAM® P y PRIVIGEN® es IgG. Por consiguiente, una preparación de IgG humana agrupada tal como una IVIG puede considerarse una preparación de IgG concentrada.

En realizaciones preferidas, la IVIG contiene al menos el 5% p/v, al menos el 10% p/v, al menos el 20% p/v o al menos el 25% de inmunoglobulina.

Se proporcionan ejemplos de preparaciones de IVIG en el documento WO 2005/023867 en la tabla 1. Todos estos ejemplos son preparaciones de IVIG preferidas que pueden aplicarse en el contexto de la presente invención.

La IgG humana agregada definida en el presente documento está marcada opcionalmente, y el marcador está conectado o bien directamente o bien indirectamente con la IgG humana agregada. "Directamente" significa de ese modo un marcador unido de manera covalente (que también puede comprender un conector), mientras que indirectamente incluye la unión de la IgG humana agregada mediante una segunda entidad marcada que se une a la IgG humana agregada, por ejemplo, un dominio de unión marcado tal como un anticuerpo o fragmentos del mismo (por ejemplo, anticuerpos anti-humano tales como un anticuerpo secundario marcado anti-IgG humana). El anticuerpo marcado secundario puede ser cualquier anticuerpo anti-IgG disponible; en los ejemplos a continuación se usó anti-IgG humana de cabra marcado con R-ficoeritrina (Dianova, n.º de cat. 109-116-088); sin embargo, están comercialmente disponibles muchos otros anticuerpos que serían igual de adecuados. Entre otros, se prevén "marcadores fluorescentes" en el contexto de la presente invención, pero la presente invención no se limita a los mismos, es decir, están asimismo previstos otros marcadores (por ejemplo, marcadores que pueden emplearse en métodos inmunológicos tales como métodos de ELISA). Los marcadores fluorescentes se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende agentes de punto cuántico, proteínas fluorescentes, colorantes

fluorescentes, colorantes fluorescentes sensibles al pH, colorantes fluorescentes sensibles al voltaje y/o microesferas marcadas fluorescentes. Se prefiere un marcador fluorescente que puede excitarse con un haz de láser y que emite luz a una longitud de onda establecida que puede detectarse por medio de un aparato de FACS.

5 Para los experimentos que condujeron a la presente invención, se usó el producto comercial Beriglobin® y se separó la IgG humana agregada de IgG monomérica y dimérica mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) preparativa (véase la descripción detallada a continuación y el ejemplo 2). Sin embargo, cualquier otra "proteína humana" tal como se describe en el presente documento podría usarse como punto de partida para el aislamiento de IgG humana agregada; por ejemplo, Beriglobin, Varitect y Vendig son productos adecuados actualmente en el
10 mercado alemán o una preparación de IgG tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, agrupando IgG de plasma de al menos 100, 200, 300, 400, 500 o más, preferiblemente 1000 o más donantes humanos. Cualquiera de estos "puntos de partida" (incluyendo proteína humana tal como se define en el presente documento, preparaciones de IgG (agrupada) tales como IVIG) pueden usarse para el aislamiento de IgG humana agregada mediante, por ejemplo, la cromatografía de exclusión molecular (SEC) preparativa (véase la descripción detallada a
15 continuación y el ejemplo 2). La FDA de los EE.UU. tiene 10 productos indicados en la actualidad. El uso de una "proteína humana", por ejemplo, Beriglobin como materia prima se prefiere particularmente, puesto que proporciona una fuente controlada para el producto de IgG humana agregada que va a usarse como patrón en las realizaciones de la invención. La IgG humana agregada puede ajustarse para tener un contenido de proteína de entre 0,35 mg/ml y 1,40 mg/ml, preferiblemente entre 0,5 y 1,35 mg/ml. El experto será consciente de que el contenido de proteína puede ajustarse diluyendo con un tampón adecuado o concentrarse, por ejemplo, mediante ultrafiltración. Se
20 proporciona orientación adicional en los ejemplos 1 y 2 de la presente invención.

En la última etapa del método para determinar la estabilidad de una composición que comprende o consiste esencialmente en receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB, la cantidad de IgG humana agregada
25 que se une a la superficie y que se determina tal como se describe en el presente documento se compara con un valor de referencia. Dicha etapa de comparación permite la determinación de la estabilidad de dicha composición tal como sigue.

Por ejemplo, cuanto mayor es la estabilidad de una composición cuya estabilidad se determina en comparación con una composición que también comprende receptores de Fc gamma, menos IgG agregada se unirá a la superficie
30 que comprende receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB, puesto que se unirá a uno o más receptores de Fc gamma humanos solubles comprendidos por dicha composición.

Por otro lado, por ejemplo, cuanto más IgG agregada se una a la superficie que comprende receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB, menos estable será la composición en comparación con una composición que también
35 comprende receptores de Fc gamma como la composición cuya estabilidad se determina según los métodos descritos en el presente documento. Sin embargo, "menos estable" no significa que la composición cuya estabilidad se determina no sea valiosa. Por el contrario, para determinadas aplicaciones puede ser deseable tener una composición que sea, por ejemplo, menos estable que una composición de referencia, puesto que puede ser
40 deseable tener una composición cuyos componentes tengan una semivida acortada, menos estabilidad al pH, etc.

Tal como se dijo, una composición de referencia también comprende uno o más de los receptores de Fc gamma humanos como la composición cuya estabilidad se determina según los métodos de la presente invención, y se
45 denomina en el presente documento composición de referencia.

Para dicha composición de referencia, el valor que refleja la cantidad de IgG humana agregada que se une a una superficie se determinó tal como se describe en el presente documento de modo que dicho valor está disponible como valor de referencia. Por tanto, el valor de referencia se determina y está, por tanto, disponible antes de que se
50 determine la estabilidad de una composición según la enseñanza de la presente invención. Por consiguiente, dicho valor de referencia puede entonces compararse con la cantidad de IgG humana agregada que se une a una superficie tal como se determina según se describe en el presente documento, cantidad que se convierte entonces en un valor que se compara con un valor de referencia. Mediante esa comparación, es posible determinar la estabilidad de una composición. De hecho, tal como se explicó, se determinó un valor de referencia y dicho valor de referencia refleja una determinada cantidad de IgG humana agregada unida a una superficie. Por tanto, el valor de
55 referencia refleja indirectamente la cantidad de IgG unida a uno o más receptores de Fc humanos solubles comprendidos por dicha composición.

Por supuesto, una composición de referencia sólo es entonces comparable con una composición cuya estabilidad se determina según las realizaciones de la presente invención si comprende ese mismo o más receptores de Fc gamma solubles en una cantidad comparable (idealmente, en la misma cantidad).
60

Un valor de referencia puede reflejar la estabilidad de una composición tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, en cuanto a estabilidad a la temperatura, estabilidad al pH, estabilidad al tampón de almacenamiento, estabilidad en anaquel, vida útil, semivida, estabilidad (o resistencia) frente a la degradación,
65 estabilidad respecto a la forma monomérica, etc. de los receptores de Fc gamma tal como se describe en el presente documento. Sin embargo, no es decisivo qué propiedad de estabilidad o parámetro de estabilidad de la

composición se determina, puesto que esto puede depender, por ejemplo, de las demandas y/o intereses y/o el propósito para el que puede usarse la composición.

De hecho, los métodos de la presente invención no se limitan a las pruebas de ningún parámetro específico que pueden influir en la estabilidad, puesto que los métodos de la presente invención permiten una lectura general de la estabilidad de una composición, porque siempre es la cantidad de IgG humana agregada que se une a una superficie tal como se describe en el presente documento la que se determina o, como alternativa, la cantidad de IgG humana agregada que se une a uno o más receptores de Fc gamma humanos solubles comprendidos por una composición cuya estabilidad se determina según la enseñanza de la presente invención.

Tal como se explicó anteriormente, cuanto menos IgG agregada se una a una superficie, más potente o todavía potente será el uno o más receptores de Fc gamma humanos solubles comprendidos en dicha composición. Por ejemplo, cuando se está interesado en la estabilidad al pH de una composición, el experto puede someter a una composición de este tipo a diversas condiciones de pH y después someter a prueba la IgG humana agregada unida a una superficie mientras está en contacto con dicha composición. Suponiendo que dicha composición es estable, por ejemplo, frente a un pH ácido, el uno o más receptores de Fc gamma humanos solubles todavía serán capaces de unirse a IgG humana agregada y, por tanto, se unirá menos IgG agregada a una superficie tal como se describe en el presente documento. Por supuesto, el experto sabe que puede que tenga que aplicar un tampón adecuado tras haber sometido a prueba la estabilidad al pH cuando se realizan los métodos de la presente invención. Por ejemplo, un entorno demasiado ácido o básico podría alterar los métodos descritos en el presente documento y, por tanto, antes de aplicarlos, el experto puede tener que ajustar o adaptar las condiciones de tamponamiento mediante medios y métodos comúnmente conocidos en la técnica.

A modo de otro ejemplo, si se está interesado en una composición que tiene una vida útil larga o resistencia frente a la degradación, se usa esa composición como composición de referencia y se determina la cantidad de IgG agregada unida a una superficie tal como se describe en el presente documento después de que se haya almacenado la composición, por ejemplo, durante uno, dos, seis o doce meses y se usa ese valor como valor de referencia para la propiedad deseada de la composición. Después de eso, dicho valor de referencia que refleja, por ejemplo, la vida útil larga o resistencia frente a la degradación, se comparará con el valor que refleja la cantidad de IgG humana agregada que se une a una superficie tal como se describe en el presente documento cuando también se pone en contacto con la composición cuya estabilidad se determina mediante los métodos de la presente invención.

Un valor de referencia que se determina, por ejemplo, tras doce meses de almacenamiento y que se considera que cumple las expectativas del profesional médico, puede establecerse para que sea, por ejemplo, 100, siendo 100 un valor relativo, puesto que simplemente refleja una determinada cantidad de IgG humana agregada unida a una superficie.

Un valor de referencia se considera aceptable si al menos el 50%, preferiblemente el 60% o el 70%, más preferiblemente el 80% o el 90% de la IgG humana agregada no se une a una superficie, pero se une a uno o más receptores de Fc gamma humanos solubles comprendidos en la composición cuya estabilidad se determina. Específicamente, tal como se explicó anteriormente, cuanto menos IgG humana agregada se una a una superficie, más se unirá a uno o más receptores de Fc gamma humanos solubles y viceversa. Por consiguiente, cuanto mayor sea la estabilidad de una composición, menos IgG humana agregada se unirá a una superficie y más se unirá a uno o más receptores de Fc gamma humanos solubles. A la inversa, cuanto menor sea la estabilidad de una composición, más IgG humana agregada se unirá a una superficie y menos se unirá a uno o más receptores de Fc gamma humanos solubles.

La presente invención también abarca un método para aislar IgG humana agregada del plasma mezclado de al menos 500 donantes (sanos o "convencionales") mediante cromatografía de exclusión molecular.

También se prevé que la IgG humana agregada de la invención se complemente con o sustituya por las correspondientes preparaciones de IgG de primates no humanos, tales como macaco cangrejero, *Callithrix*, *Macaca*, *Saguinus* o similares.

Los "Fc γ R1IA, Fc γ R1IB, Fc γ R1IIIA o Fc γ R1IIIB humanos solubles" de la invención son, por ejemplo, los descritos en los documentos EP 1 135 486 y EP 1 642 974 y EP 1 446 139. Los "Fc γ R1IA, Fc γ R1IB, Fc γ R1IIIA o Fc γ R1IIIB humanos solubles" de la invención se caracterizan en una realización preferida por la ausencia de dominios transmembrana y péptidos señal. Los Fc γ R solubles reivindicados de la invención comprenden o consisten en una realización preferida de una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de SEQ ID NO.: 1 (SM101, Fc γ R1IB humano recombinante), SEQ ID NO.: 3 (Fc γ R1IB), SEQ ID NO.: 5 (Fc γ R1IA), SEQ ID NO.: 7 (Fc γ R1IIIA) o SEQ ID NO.: 9 (Fc γ R1IIIB) codificada por las secuencias de ácido nucleico respectivas SEQ ID NO.: 2, 4, 6, 8 y 10. La invención también abarca Fc γ R solubles que tienen al menos el 90%, preferiblemente el 95% de identidad con respecto a las proteínas de SEQ ID NO.: 1, 3, 5, 7 o 9. Para la determinación de la identidad de secuencia se hace una comparación alineando las secuencias de manera que proporcione la máxima correspondencia de aminoácidos. En una realización preferida de

la invención, el receptor de Fc gamma humano soluble es Fc γ RIIB (SEQ ID NO.: 3). En una realización más preferida, el receptor humano soluble es SM101 (SEQ ID NO.:1), que es un receptor Fc γ RIIB soluble. En una realización adicional preferida de los métodos de la invención, sólo un receptor soluble (o, tal como se mencionó anteriormente, una mezcla de proteínas que tenían todas al menos el 90% de identidad con respecto al receptor de interés) debe someterse a prueba cada vez.

Las secuencias a las que se refiere la presente solicitud se representan a continuación.

SEQ ID NO. 1 (SM101)

MAPPKAVLKL EPQWINVLIQE DSVTLTCRGT HSPESDSIQW FHNGNLIPTH
 TQPSYRFKAN NNDSGEYTCQ TGQTSLSDPV HLTVLSEWLV LQTPHLEFQE
 GETIVLRCHS WKDKPLVKVT FFQNGKSKKF SRSDPNFSIP QANHSHSGDY
 HCTGNIGYTL YSSKPVITIV QAPSSSP

SEQ ID NO. 2 (SM101, ADNc)

1 ATGGCACCGC CGAAAGCAGT TCTGAAACTG GAACCGCAGT GGATTAACGT TCTGCAGGAA
 61 GATAGCGTTA CCCTGACCTG TCGTGGCACC CATAGCCCGG AAAGCGATAG CATTTCAGTGG
 121 TTTCACAACG GCAATCTGAT TCCGACCCAT ACCCAGCCGA GCTATCGTTT TAAAGCGAAC
 181 AACACGATA GCGGCGAATA TACCTGTCAG ACCGGTCAGA CCAGCCTGAG CGATCCGGTT
 241 CATCTGACCG TTCTGAGCGA ATGGCTGGTT CTGCAGACCC CGCATCTGGA ATTTTCAGGAA
 301 GCGGAAACCA TTGTTCTGCG TTGCCACAGC TGGAAAGATA AACCGCTGGT TAAAGTTACC
 361 TTCTTCCAGA ACGGCAAAAAG CAAAAAATTC AGCCGTAGCG ATCCGAATTT TAGCATTCCG
 421 CAGGCGAATC ATAGCCATAG CGGCGATTAT CATTGTACCG GCAACATTGG CTATACCCTG
 481 TATAGCAGCA AACCGGTGAC CATTACCGTT CAGGCGCCGA GCAGCAGCCC GTAA

SEQ ID NO. 3 (Fc γ RIIB humano)

MGTPAAPPKA VLKLEPQWIN VLQEDSVTLT CRGTHSPESD SIQWFHNGNL IPTHTQPSYR
 FKANNDSGE YTCQTGQTSL SDPVHLTVLS EWLVLQTPHL EFQEGETIVL RCHSWKDKPL
 VKVTFQNGK SKKFSRSDPN FSIPQANHSH SGDYHCTGNI GYTLYSSKPV TITVQAPSSS
 P

SEQ ID NO. 4 (Fc γ RIIB humano, ADNc)

1 atggggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaaac tcgagcccca gtggatcaac
 61 gtgctccagg aggactctgt gactctgaca tgccggggga ctcacagccc tgagagcgac
 121 tccattcagt ggtccacaa tgggaatctc attcccaccc acacgcagcc cagctacagg
 181 ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc
 241 agcgaccctg tgcactctgac tgtgctttct gagtggctgg tgctccagac ccctcacctg
 301 gagttccagg aggagaaaac catcgtgctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg
 361 gtcaagggtca cattcttcca gaatggaaaa tccaagaaat tttcccgttc ggatcccaac
 421 ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac agtgggtgatt accactgcac aggaaacata
 481 ggctacacgc tgtactcatc caagcctgtg accatcactg tccaagctcc cagctcttca
 541 ccg

SEQ ID NO. 5 (Fc γ RIIA humano)

MGTPAAPPKA VLKLEPPWIN VLQEDSVTLT CQGARSPESD SIQWFHNGNL IPTHTQPSYR
 FKANNDSGE YTCQTGQTSL SDPVHLTVLS EWLVLQTPHL EFQEGETIML RCHSWKDKPL
 VKVTFQNGK SQKFSLDPT FSIPQANHSH SGDYHCTGNI GYTLFSSKPV TITVQVPSMG
 SSSP

SEQ ID NO. 6 (Fc γ RIIA humano, ADNc)

ES 2 687 716 T3

1 atggggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaaac ttgagcccc gtggatcaac
61 gtgctccagg aggactctgt gactctgaca tgccaggggg ctgcagccc tgagagcgac
121 tccattcagt ggttccacaa tgggaatctc attcccaccc acacgcagcc cagctacagg
181 ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc
241 agcgaccctg tgcattctgac tgtgctttcc gaatggctgg tgctccagac cctcaccctg
301 gagttccagg agggagaaac catcatgctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg
361 gtcaaggcca cattcttcca gaatggaaa tcccagaaat tctcccattt ggatcccacc
421 ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac agtgggtgatt accactgcac aggaaacata
481 ggctacacgc tgttctcatc caagcctgtg accatcactg tccaagtgcc cagcatgggc
541 agctcttcac caat

SEQ ID NO. 7 (Fc γ RIIIA humano)

MDLPKAVVFL EPQWYRVLEK DSVTLKCOGA YSPEDNSTQWF HNESLISSQA SSYFIDAATV
DDSGEYRCQ TNLSTLSDPV QLEVHIGWLL LQAPRWVFKEE DPIHLRCHSW KNTALHKVTY
LQNGKGRKY FHHNSDFYIP KATLKDSGSY FCRGLVGSKNV SSETVNITIT QGLSVSTISS
5 F

SEQ ID NO. 8 (Fc γ RIIIA humano, ADNc)

1 atggatctcccaa aggctgtggt gttcctggag cctcaatggt acaggggtgct
cgagaaggac
61 agtgtgactc tgaagtgcc gggagcctac tcccctgagg acaattccac acagtggttt
121 cacaatgaga gcctcatctc aagccaggcc tcgagctact tcattgacgc tgccacagtt
181 gacgacagtg gagagtacag gtgccagaca aacctctcca ccctcagtga cccgggtgcag
241 ctagaagtcc atatcggctg gctgttgetc caggccctc ggtgggtggt caaggaggaa
301 gaccctattc acctgaggtg tcacagctgg aagaacactg ctctgcataa ggtcacatat
361 ttacagaatg gcaaaggcag gaagtatttt catcataatt ctgacttcta cattccaaaa
421 gccacactca aagacagcgg ctctacttc tgcagggggc ttgttgggag taaaaatgtg
481 tcttcagaga ctgtgaacat caccatcact caaggtttgt cagtgtcaac catctcatca
541 ttc
10

SEQ ID NO. 9 (Fc γ RIIIB humano)

MDLPKAVVFL E PQWYSVLEKD SVTLKCOGAY SPEDNSTQWF HNEENLISSQA SSYFIDAATV
NDSGEYRCQT NLTSLSDPVQ LEVHIGWLLL QAPRWVFKEE DPIHLRCHSW KNTALHKVTY
LQNGKDRKYF HHHNSDFHIPK ATLKDSGSYF CRGLVGSKNV SSETVNITIT QGLAVSTISS
F

SEQ ID NO. 10 (Fc γ RIIIB humano, ADNc)

1 atggatctcc caaaggctgt ggtgttctctg gagcctcaat ggtacagcgt
gcttgagaag
61 gacagtgtga ctctgaagtg ccaggagacc tactcccctg aggacaattc
cacacagtgg
121 tttcacaatg agaacctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga
cgctgccaca
181 gtcaacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag
tgaccgggtg
241 cagctagaag tccatctcgg ctggctggtg ctccaggccc ctcggtgggt
ggtcaaggag
301 gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca
taaggtcaca
361 tatttacaga atggcaaaga caggaagtat tttcatcata attctgactt
ccacattcca
421 aaagccacac tcaaagatag cggctcctac ttctgcaggg ggcttgttgg
gagtaaaaat
481 gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaagggt tggcagtgct
aaccatctca
541 tcattc

Aunque las realizaciones de la invención se refieren a Fc γ R humanos, también podrían aplicarse a Fc γ R de otros mamíferos, específicamente a los de ratones o primates tales como monos.

La “superficie que comprende receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB” es o comprende en algunas realizaciones una célula o línea celular, preferiblemente una célula de mamífero o una línea celular de mamífero que expresa uno o más receptores de Fc gamma humanos IIA, IIB, IIIA y/o IIIB. Estas células expresan en algunas realizaciones el receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA o IIIB en ausencia de cualquier otro receptor de Fc gamma humano, es decir, estas células/líneas celulares sólo expresan un Fc γ R. Se prefiere particularmente que dicha superficie que comprende receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB comprenda básicamente, o incluso exclusivamente, Fc γ RIIB humano. En una realización adicional preferida, el subtipo del receptor de Fc gamma humano comprendido en dicha superficie y el subtipo del receptor de Fc gamma humano comprendido en dicha composición de receptor de Fc gamma humano soluble es idéntico. Cuando está sometiéndose a prueba Fc γ RIIB, las células expresan preferiblemente sólo Fc γ RIIB, tal como la línea celular linfoblastoide Raji (CCL-86, ATCC). Para Fc γ RIIA puede usarse la línea celular eritroleucémica K562 (CCL-243, ATCC), y para Fc γ RIIIA puede usarse la línea celular NKL (Robertson *et al.*, Exp. Haematol. 1996, 24(3):406-15). Alternativamente, pueden usarse células CHO transfectadas con el/los FcR de interés. En la técnica se conocen bien métodos para la transfección de células CHO para expresar una proteína de interés; este método se describe, por ejemplo, en Bruhns *et al.*, Blood 2009, 113:3716-3725.

También se prevé que la “superficie que comprende receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB” sea o comprenda una superficie sólida que puede recubrirse con receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB. Una “superficie sólida” comprende de ese modo o bien un material particulado (perlas) que, por ejemplo, puede atraerse magnéticamente o una superficie plana tal como una placa para ELISA o una unidad de detección Biacore. El material de dicha superficie puede ser cualquier material sólido adecuado tal como plástico, polímeros, metal, vidrio, etc. que puede emplearse en los métodos respectivos. El recubrimiento de proteínas como receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB en una superficie sólida (por ejemplo, una superficie plana o una superficie particulada) se lleva a cabo mediante métodos convencionales que los conoce bien el experto. El recubrimiento de una superficie sólida puede llevarse a cabo con “Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA o Fc γ RIIIB humano” y/o con “Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA o Fc γ RIIIB humano soluble” de la invención, puesto que no hay necesidad de expresión biológica sobre la superficie celular (lo que requeriría un anclaje a la membrana).

En una realización preferida, la invención se basa en el uso de IgG humana agregada en un método *in vitro* para determinar la actividad de unión de receptores de Fc gamma humanos solubles. La primera etapa del método de la invención comprende poner en contacto una célula de mamífero de una línea celular que expresa sólo uno de los receptores de Fc gama humanos IIA, IIB, IIIA o IIIB (preferiblemente en ausencia de cualquier otro receptor de Fc γ) con una cantidad establecida de IgG humana agregada y una cantidad establecida del correspondiente receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB IIIA o IIIB. Se prefiere que las células de mamífero elegidas para la primera etapa del método expresen sólo el receptor de Fc gamma de interés y, si es posible, ningún otro receptor de Fc gamma, puesto que la presencia de receptores adicionales que se unen a IgG podría interferir con la actividad del Fc γ R soluble que está sometiéndose a prueba.

“Determinar la cantidad de IgG humana agregada que se une a dicha superficie” se refiere a la medición o cuantificación de la cantidad de IgG humana agregada unida a la superficie, es decir, lo que se mide preferiblemente en el contexto de la presente invención es la cantidad de IgG humana agregada que se une a la superficie que comprende receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB. Dicha IgG humana agregada unida se detecta, por ejemplo, por medio de un marcador indirecto (por ejemplo, un dominio de unión anti-IgG humana) o por medio de un marcador directo (es decir, la IgG humana agregada se marca directamente, tal como se explica en el presente documento en otra parte). Por ejemplo, un nivel bajo de anticuerpo secundario marcado unido a la IgG humana agregada indica un nivel alto de unión del Fc γ R soluble a la IgG humana agregada y viceversa.

Asimismo, es alternativa o adicionalmente posible analizar, medir o cuantificar la cantidad de IgG humana agregada que se retiró mediante lavado (antes de la etapa (c) de los métodos de la invención), dicha IgG humana agregada se une al Fc γ R soluble de interés (que estaba comprendido en la composición) y se elimina por lavado junto con el mismo.

La “etapa de poner en contacto” de los métodos de la invención implica poner la superficie, el receptor y la IgG humana agregada en contacto físico entre sí, de modo que pueden unirse entre sí. Esta etapa puede implicar una etapa de incubación, de modo que los reactivos tienen tiempo para reaccionar.

El término “cantidad establecida” indica simplemente que la cantidad de los respectivos reactivos debe fijarse, de modo que los resultados pueden estimarse o incluso cuantificarse. Por ejemplo, y tal como puede observarse a partir de los ejemplos a continuación, se empleó una cantidad convencional de IgG humana agregada con una dilución en serie del receptor soluble, de modo que la cantidad a la que el receptor soluble inhibe la unión de IgG humana agregada a la superficie puede determinarse.

La etapa de lavado del método de la invención implica la retirada de IgG humana agregada no unida y Fc γ R humano soluble no unido mediante "lavado" antes de la etapa (c). Debe indicarse que esta etapa se refiere a la retirada de reactivos que no están unidos a la superficie usada en el método. La etapa de lavado puede realizarse con cualquier tampón convencional, tal como el tampón de FACS usado en los ejemplos a continuación.

5 Cuando se aplica a una dilución en serie del Fc γ R soluble de la invención, la "detección" del marcador permite la determinación de la CI₅₀ del Fc γ R soluble. La "concentración inhibitoria máxima media (CI₅₀)" es una medida de la eficacia de un compuesto en la inhibición de la función biológica o bioquímica. Esta medida cuantitativa indica cuánto se necesita de un fármaco particular u otra sustancia para inhibir un proceso biológico a la mitad. Es decir, es la concentración inhibitoria (CI) máxima media (50%) de una sustancia (el 50% de la CI, o CI₅₀). Se usa comúnmente como una medida de potencia de fármacos antagonistas en investigación farmacológica. Según la FDA, la CI₅₀ representa la concentración de un fármaco que se requiere para conseguir el 50% de inhibición *in vitro*. Por tanto, en el presente contexto, la cantidad de IgG agregada unida a las células de mamífero en comparación con la cantidad de IgG agregada usada en el método permite la determinación de la cantidad del Fc γ R necesaria para inhibir el 50% de la unión de IgG agregada a la célula. Asimismo, pudo medirse la CI₉₅, que es la cantidad necesaria para inhibir el 95% de la unión de IgG a las células. El experto en la técnica puede usar cualquier otra técnica de evaluación para los datos, por ejemplo, el método logístico de cuatro parámetros (4PL) según la Farmacopea europea 5.0; 2005; capítulo 5.3 ("Statistical analysis of results of biological assays and tests").

20 En una realización particularmente preferida del método *in vitro* de la invención, el receptor humano soluble es Fc γ RIIB (SEQ ID NO.: 3), incluso más preferiblemente SM101 (SEQ ID NO.: 1), las células son células Raji, la IgG humana agregada se aísla a partir de una preparación de IgG humana, por ejemplo, Beriglobin® y el anticuerpo secundario tiene un marcador de fluorescencia que puede excitarse con un haz de láser y que emite luz a una longitud de onda establecida que puede detectarse por medio de un aparato de FACS.

25 La invención también se refiere a un kit que comprende una superficie de la invención y/o la IgG humana agregada de la invención. Dicho kit puede comprender además medios que son necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención (por ejemplo, un marcador, tampones, valores de referencia, controles, patrones, etc.).

30 La invención también se refiere a IgG humana agregada tal como se divulga en el presente documento.

En los experimentos descritos a continuación, se encontró, usando el método *in vitro* de la invención, que SM101 (Fc γ RIIB humano soluble, SEQ ID NO.: 1) compite con Fc γ RIIB unido a células en células Raji por la unión a IgG agregada, y que aumentar las concentraciones de SM101 añadido a cantidades constantes de células y Beriglobin agregado da como resultado la inhibición progresiva de la unión de IgG agregada a Fc γ RIIB unido a membrana. Esta prueba permite la determinación de posibles dosificaciones de SM101 necesarias para aplicaciones médicas o de diagnóstico. El método también puede usarse en el control de calidad de SM101 para garantizar que diferentes lotes tengan actividad de unión constante. Asimismo, el método puede aplicarse a cualquier otro Fc γ R soluble con el fin de determinar posibles dosificaciones y como control de calidad para garantizar que diferentes lotes de Fc γ R soluble tengan la misma actividad de unión. Por tanto, el método *in vitro* de la invención proporciona una nueva prueba para determinar la actividad de unión de Fc γ R solubles basándose en el hallazgo de que puede usarse IgG agregada para imitar inmunocomplejos de IgG *in vitro*.

45 Específicamente, en el ejemplo 1 a continuación, el método *in vitro* de la invención, también denominado "el ensayo de potencia basado en células para SM101", permite una determinación de la actividad/función biológica de SM101. El uso de la línea de células B humanas establecida Raji e IgG humanas agregadas policlonales (Beriglobin, fracción agregada) representa una excelente configuración para analizar la actividad de SM101 por medio de un ensayo basado en células. En los ejemplos, SM101 ha mostrado inhibición de la unión de IgG humanas agregadas a Fc γ RIIB unido a membrana en células Raji en varios experimentos de FACS diferentes. Se usó una dilución en serie de SM101 para determinar los valores de CI₅₀ para SM101. En el ejemplo 1 a continuación se usó la dilución en serie con concentraciones finales de 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,01565, 0,0078, 0,0039, 0,00195 μ g/ μ l, aunque también podrían usarse las series de 1,3664, 0,80, 0,40, 0,20, 0,10, 0,06, 0,036, 0,0216, 0,01296, 0,00648, 0,003888, 0,001944 μ g/ μ l o cualquier otra serie de dilución que permita una curva lineal en el área de interés, aunque también podrían usarse otras series de concentración. La K_D aparente medida de 0,98x10⁻⁶ M es comparable con los datos encontrados en la bibliografía de 1,4x10⁻⁶ M usando Fc γ RIIB soluble derivado de células de insecto (glicosilado) (Sondermann *et al.*, Biochemistry 1999, 38(26):8469-77) o de 1,67x10⁻⁶ M usando sFc γ RIIB recombinante de *E. coli* (Maenaka *et al.*, J Biol Chem. 2001, 276(48):44898-904). La CI₅₀ calculada de SM101 de 17,7 μ g/ml (ejemplo 1) encaja con los valores de CI₅₀ tal como se determinó en otros ensayos.

60 En el ejemplo 1.6, los inventores fueron capaces de demostrar que la actividad biológica de la especialidad farmacéutica en investigación de SM101 es comparable con la del patrón de referencia. Específicamente, respecto al método reivindicado de determinación de la actividad de unión, el ejemplo 1 proporciona un protocolo detallado para Fc γ RIIB humano soluble usando células Raji. El experto sería muy consciente de los ajustes necesarios para adaptar este método a otros receptores y tipos de célula. El protocolo a modo de ejemplo usado en el ejemplo 1 se repite a continuación, pero el experto es muy consciente de posibles variaciones en este protocolo:

ES 2 687 716 T3

1. Determinar la concentración celular de un cultivo de células Raji
2. Recoger células Raji mediante centrifugación
- 5 3. Preparar series de concentración de receptor de Fc gamma (por ejemplo, SM101) en placa de pocillos
4. Preparar tampón de Beriglobin agr. = "mezcla de Beri agr."
- 10 5. Resuspender células Raji de la etapa 2 en la "mezcla de Beri agr." de la etapa 4
6. Añadir suspensión de células Raji a cada pocillo que contiene las series de concentración de receptor de Fc gamma (por ejemplo, SM101)
7. Incubar sobre hielo
- 15 8. Añadir "tampón de FACS" a cada pocillo y centrifugar
9. Desechar el sobrenadante
- 20 10. Añadir mezcla de anticuerpo secundario a cada pocillo
11. Añadir "tampón de FACS" y centrifugar
12. Desechar el sobrenadante
- 25 13. Añadir "tampón de FACS" y transferir la muestra a tubos de poliestireno y analizar en FACS.

El ejemplo 2 proporciona un método específico para el aislamiento de IgG agregada a partir de Beriglobin. De nuevo, el experto sería muy consciente de las posibles variaciones de este método que conducirían a un resultado similar. Específicamente, el método para la producción de IgG agregada divulgado en este documento puede resumirse mediante las siguientes etapas:

1. Ajustar Beriglobin® 160 mg/ml a 100 mg/ml con PBS-N
- 35 2. Separar mediante SEC (cromatografía de exclusión molecular) preparativa usando una columna que puede separar IgG agregada de IgG monomérica o dimérica, por ejemplo columna: Superdex 200 10/300 GL, fase móvil: His 5 mM, NaCl 150 mM pH 6,5, NaN₃ al 0,01% (p/v), flujo de 0,5 ml/min a temperatura ambiente, inyección: 100 µl con 0,4 g/l (véase la figura 12)
- 40 3. Determinar el contenido en proteínas de la fracción de IgG agregada
4. *Opcional:* si el contenido es <0,50 mg/ml, concentrar mediante ultrafiltración o si el contenido es >1,40 mg/ml, diluir con PBS-N (solución salina tamponada con fosfato con azida de sodio al 0,02%)
- 45 5. Ajustar con glicerol hasta el 20% (v/v)
6. Tomar alícuotas de 0,5 ml y ultracongelar en nitrógeno líquido.

El método mencionado anteriormente para el aislamiento de IgG agregada también puede aplicarse a cualquier otra preparación de IgG humana, por ejemplo, tal como está disponible en la técnica o se describe en el presente documento.

En el ejemplo 3, se sometieron a prueba el contenido y la pureza de la IgG agregada aislada según el ejemplo 2. Por tanto, los ejemplos 2 y 3 proporcionan al experto orientación específica sobre la IgG agregada que va a usarse en el método de la invención. Específicamente, al usar SEC (cromatografía de exclusión molecular) a 1 ml/min usando PBS-N (solución salina tamponada con fosfato con azida de sodio al 0,02%) como tampón, se encontró que la IgG agregada eluía tras aproximadamente 115 ml cuando se usa un dispositivo Superdex 200, HiLoad 26/60, GE Healthcare, usando Äkta Explorer 10 FPLC o cualquier otro FPLC adecuado. El contenido en proteínas del eluato se midió entonces según la etapa 1 del ejemplo 3 y, si es necesario, se ajustó hasta un valor de entre 0,30 y 1,4 mg/ml, preferiblemente entre 0,50 y 1,35 mg/ml, incluso más preferiblemente entre. Después de esto, se midió el contenido de pureza de la IgG agregada según el método del ejemplo 2, etapa 2 y se garantizó que el área de pico relativa de IgG agregada/oligomérica fuera de al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, el 90% y lo más preferiblemente al menos el 95%.

Se estudió además la robustez del método de la invención en experimentos de validación previa (ejemplos 4-10), sometiendo a prueba la influencia de la calidad de IgG agregada usada, el efecto de cantidades variables de IgG

monomérica en la muestra de prueba, la estabilidad de expresión de Fc γ R1IB unido a membrana en células Raji cultivadas o recién descongeladas, el efecto de bloqueo de Fc γ R1IB unido a membrana en Raji mediante anticuerpo monoclonal y para determinar la estabilidad de la tinción de fondo del anticuerpo secundario anti-humano usado en células Raji. Se valoró la estabilidad dentro del ensayo y entre ensayos comparando los valores medios obtenidos de K_D aparente y Cl₅₀ de n = 25 experimentos. Por tanto, puede concluirse que el método *in vitro* de la invención (el ensayo de potencia basado en células) es una herramienta adecuada para evaluar la potencia de nuevos lotes de SM101 en comparación con el patrón de referencia.

Los hallazgos anteriores y los métodos y protocolos específicos descritos en los ejemplos también podrían aplicarse a Fc γ R1IA, Fc γ R1IIIA o Fc γ R1IIIB en combinación con células adecuadas tales como la línea celular eritroleucémica humana K562 para Fc γ R1IA o células NKL humanas para Fc γ R1IIIA. Alternativamente, pudieron transfectarse células de ovario de hámster chino (células CHO) con el Fc γ R de interés y usarse en el método *in vitro* de la invención. Con respecto a los métodos de preparación de IgG agregada del ejemplo 2 y los controles del ejemplo 3, estos métodos se aplicarían igualmente a otros productos de preparación de IgG humana en el mercado tales como Varitect o Venbig, que podrían usarse en lugar de Beriglobin.

Debe indicarse que, tal como se usan en el presente documento, las formas en singular “un”, “una” y “el/la”, incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “un reactivo” incluye uno o más de tales reactivos diferentes y la referencia a “el método” incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos habituales en la técnica que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en el presente documento.

A menos que se indique lo contrario, el término “al menos” que precede a una serie de elementos, ha de entenderse que se refiere a cada elemento en la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Se pretende que tales equivalentes estén abarcados por la presente invención.

En toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, el término “comprender”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, se entenderá que implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas establecidos, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. Cuando se usa en el presente documento, el término “que comprende” puede sustituirse por el término “que contiene” o, a veces cuando se usa en el presente documento, por el término “que tiene”.

Cuando se usa en el presente documento “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o componente no especificado en el elemento de la reivindicación. Cuando se usa en el presente documento, “que consiste esencialmente en” no excluye materiales o etapas que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de la reivindicación.

Tal como se usa en el presente documento, “realización preferida” significa “realización preferida de la presente invención”. Asimismo, tal como se describe en el presente documento, “diversas realizaciones” y “otra realización” significan “diversas realizaciones de la presente invención” y “otra realización de la presente invención”, respectivamente.

Figuras

Las figuras muestran:

Figura 1: Estrategia de selección para el análisis de FACS que muestra SSC-A/FSC-A de 1×10^5 células Raji. G1 comprende células viables (el 94,9% de células totales). Se analizan células viables para determinar la unión de anticuerpo secundario (α hu IgG(H+L)-PE) a IgG humana agregada unida a membrana (Beriglobin agr.) en ausencia de SM101. Diagrama de gráfico de puntos incluido para ilustración de la distribución de la población únicamente, el gráfico de histograma en el extremo derecho representa células Raji con IgG agregada humana unida (Beriglobin agr.).

Figura 2: Solapamiento de histogramas de muestras incubadas con concentraciones de SM101 variables (Fc γ R1IB humano) (concentración más baja 0 μ g/ μ l, intervalo de concentración de las muestras 0,0078 - 0,5 μ g/ μ l). Un desplazamiento de los histogramas correspondientes en el solapamiento en la dirección del control negativo (tinción con anticuerpo secundario solo (= sek AK, rojo sombreado) indica inhibición de la unión de IgG agregadas humanas (Beriglobin agr.) a células. Se muestra la mediana de fluorescencia de PE-A de muestras en el lado derecho.

Figura 3: Solapamiento de histogramas de experimento de control usando albúmina sérica de pollo (CSA) en concentraciones variables de SM101 (concentración más baja 0 μ g/ μ l, intervalo de concentración de las muestras 0,0078 - 0,5 μ g/ μ l). Control negativo (SM101_ sekAK.fcs; tinción de células con anticuerpo secundario únicamente en rojo sombreado).

Figura 4: Se ajustaron valores de mediana medidos normalizados a partir de la tabla 1 del ejemplo 1 a la ecuación de Langmuir.

5 Figura 5: Datos ajustados a la función logística sigmoidea que muestran el % de inhibición frente a la concentración másica de SM101 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) usando datos del experimento de FACS 7 (FACS007).

Figura 6: Diagrama de Langmuir de datos ajustados a valores de mediana medidos normalizados de patrón de referencia de SM101 y SM101 IMP tal como se calcula en la tabla 3 (datos de FACS021).

10 Figura 7: Purificación de IgG agregada mediante SEC preparativa. Se muestra la densidad óptica del eluato a 280 nm (trazo superior), 260 nm (trazo inferior) y la conductividad (trazo de línea). Las fracciones de IgG humana agregada agrupadas están sombreadas en gris.

15 Figura 8: SEC analítica de diversas fracciones de IgG humana agregada. Se muestran cromatogramas tras inyección de tampón de blanco (trazo inferior, línea), inyección de 50 μg de IgG monomérica de Beriglobin® (trazo con el mayor pico) correspondiente al pico a aproximadamente 180 ml en el cromatograma de SEC preparativa c.f., inyección de 50 μg de IgG dimérica de Beriglobin® (trazo con el menor pico) correspondiente al pico a aproximadamente 145 ml en el cromatograma de SEC preparativa c.f., inyección de 24 μg de IgG agregada/oligomérica del lote 27/10/10 (superposición inferior del primer pico) e inyección de 24 μg de IgG agregada/oligomérica del lote 15/07/11 (superposición superior del primer pico). Se presentan el cromatograma completo (a) y una sección aumentada (b).

20 Figuras 9a/b: Integración a modo de ejemplo de cromatogramas de SEC analítica del lote de IgG humana agregada 27/10/10 (a) y el lote 15/07/11 (b).

25 Figura 10: Análisis de FACS de cantidades variables y diferentes lotes (Beri 1, Beri 2 o Beri 3) de IgG humana agregada unida a células viables Raji.

30 Figura 11: (a) Dependencia del pH de la unión de IgG agregada a células Raji (mediana de IMF) (b) mediana de IMF de la dependencia del pH. Gráfico que muestra la mediana de IMF de la muestra – mediana de IMF de anticuerpo secundario (control).

35 Figura 12: Aislamiento de IgG agregada de dos preparaciones de IgG agrupadas disponibles (Beriglobin, lote n.º 26840311A y Subcuvia, lote n.º BVNG1M032A), columna: Superdex 200 10/300 GK; fase móvil: His 5 mM, NaCl 150 mM pH 6,5, NaN_3 al 0,01% (p/v); flujo: 0,5 ml/min a temperatura ambiente; inyección: 100 μl con 0,4 g/l.

Ejemplos

40 Los siguientes ejemplos ilustran la invención. No debe interpretarse que estos ejemplos limitan el alcance de esta invención. Los ejemplos se incluyen con el propósito de ilustración y la presente invención está limitada únicamente por las reivindicaciones. Se usan las siguientes abreviaturas en los ejemplos (y en la descripción):

g	aceleración gravitacional de la Tierra
45 C	cromatografía de líquidos de alta resolución
MWCO	corte de peso molecular en kDa
50 PBS-N	Solución salina tamponada con fosfato con azida de sodio al 0,02%
rpm	revoluciones por minuto
SEC	cromatografía de exclusión molecular
55 FSC	Dispersión frontal
SSC	Dispersión lateral
60 IgG	Inmunoglobulina G
PE	Ficoeritrina
FACS	Clasificación celular activada por fluorescencia
65 DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

ELISA Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

IMP Especialidad farmacéutica en investigación

5 UA Unidades de absorbancia

Ejemplo 1

1.1 Resumen del experimento

10 En este ejemplo se usó el método *in vitro* de la invención (también denominado ensayo de potencia de FACS) para determinar la actividad de unión de SM101 (Fc γ RIIB, sFc γ RIIB humano soluble).

15 Específicamente, se incubaron células humanas de la línea celular Raji (DSMZ n.º ACC319, linfoma de Burkitt humano) que expresaban Fc γ RIIB con una cantidad constante de ligando agregado (IgG humana) y cantidades variables de SM101 (es decir, sFc γ RIIB SEQ ID NO.: 1). SM101 compite con la proteína de Fc γ RIIB unida a células, que representa el único receptor de Fc γ (unión a IgG) expresado en Raji.

20 Puede detectarse IgG agregada unida a células que expresan Fc γ RIIB por medio de anticuerpo secundario policlonal marcado por fluorescencia que reconoce tanto la cadena pesada como ligera de IgG humana, seguido por análisis de FACS de las células. Concentraciones crecientes de SM101 añadido a cantidades constantes de células e IgG agregadas dan como resultado una inhibición progresiva de la unión de IgG a Fc γ RIIB unido a membrana. Se usan muestras de control en paralelo con células no teñidas, así como células incubadas exclusivamente con anticuerpo secundario para determinar tanto la autofluorescencia de las células usadas como la unión inespecífica de anticuerpo secundario.

25 Se llevó a cabo análisis de FACS registrando 1×10^4 células viables en una máquina FACS-Canto-II de Becton, Dickinson & Company (BD) usando software FACS-Diva de BD. Se evaluaron los datos usando software FlowJo (Treestar Inc. OR/EE.UU.).

30 1.2 Materiales:

- Placas: forma de U, 96 pocillos (Cellstar, n.º 650180)

35 - Tubos: tubos Falcon de 15 ml

5 ml, poliestireno, 12 x 75 mm (BD, n.º 352054)

40 - Pipetas: estériles, filtradas de 10 ml, 5 ml (TPP n.º 94010, 94005), puntas Filter graduadas de 1-200 μ l, 101 - 1000 μ l (StarLab, n.º S1120-8810 y S1126-7810)

- Cinta adhesiva de microplacas (83 mm, 66 m, Permacel, n.º 25082)

45 - Patrón de referencia de SM101 (sFc γ RIIB):

8,2 mg/ml, 416 μ M almacenado a -80°C

- Tampón de FACS:

50 HBSS (Gibco, n.º 14175) + FCS al 5% (Gibco, n.º 10270-106) + azida de sodio al 0,01% (p/v) (Merck)

- Medio de cultivo celular:

Medio TM:

55 RPMI (Gibco, n.º 31570) + MEM-NEA al 1% (Gibco, n.º 11140) + piruvato de sodio al 1% (Gibco, n.º 11360) + GlutaMAX-I 2 mM (disolución madre 200 mM, Gibco, n.º 35050-061) + FCS al 10% (Gibco, n.º 10270-106)

60 - IgG (Beriglobin agregado):

65 IgG 0,96 mg/ml en PBS/azida de sodio al 0,02% (p/v) con glicerol al 20% (v/v), almacenada a -80°C. Aislada mediante cromatografía de exclusión molecular en Superdex-200 (16/60) o Superdex 200 (10/300) GL. Material de partida: Beriglobin® (ZLB Behring GmbH, Ch.-B. 23840311B o Ch.-B. 26840311A; ampolla de 5 ml) o Subcuvia® Ch.-B. BVNG1M032A

ES 2 687 716 T3

- Anticuerpo secundario:

Fragmento (Fab)₂ anti-IgG humana de cabra (H+L) conj. con R-ficoeritrina (Dianova, n.º de cat. 109-116-088).

5 1.3 Protocolo:

1. Determinar la concentración celular de un cultivo de células Raji con una densidad de 0,2 - 1,0 x 10⁶ células/ml.

10 2. Recoger 1,2 x 10⁶ células Raji, centrifugar 5 min a 477 x g en un tubo Falcon de 15 ml.

3. De aquí en adelante, todas las etapas deben realizarse sobre hielo o a 4°C.

15 4. Preparar series de concentración de SM101 en placa de 96 pocillos (fondo de U) empezando con SM101 1,0 µg/µl y terminando con 0,0039 µg/µl (diluyente: "tampón de FACS"), así como muestras de control (SM101 0 µg/µl que va a usarse para anticuerpo secundario únicamente) añadiendo 50 µl de medio TM a pocillos de control correspondientes.

20 5. Preparar 500 µl de Beriglobin agregado 50 µg/ml en tampón de FACS (por ejemplo, añadiendo 26,04 µl de una disolución madre 0,96 µg/µl a 473,96 µl de tampón de FACS) = "mezcla de Beri agr."

25 6. Resuspender 1,2 x 10⁶ células Raji de la etapa 2 en los 500 µl de "mezcla de Beri agr." de la etapa 5 y mezclar concienzudamente (vórtex, 30 s, velocidad media).

30 7. Añadir 50 µl de suspensión de células Raji a cada pocillo que contiene 50 µl de las series de concentración de SM101 y a los pocillos de control (volumen final = 100 µl).

8. Incubar durante 30 min sobre hielo en la oscuridad.

35 9. Añadir 150 µl de "tampón de FACS" a cada pocillo, sellar los pocillos usando cinta adhesiva y centrifugar durante 5 min a 513 x g.

10. Preparar 1 ml de mezcla de anticuerpo secundario 1/100 en "tampón de FACS".

40 11. Desechar el sobrenadante y agitar en vórtex la placa brevemente con sellos sobre los pocillos para evitar la contaminación cruzada.

12. Añadir 50 µl de mezcla de anticuerpo secundario a cada pocillo, excepto al control no teñido.

45 13. Incubar durante 30 min sobre hielo en la oscuridad.

14. Añadir 150 µl de "tampón de FACS" y centrifugar durante 10 min a 513 x g.

15. Desechar el sobrenadante y agitar en vórtex la placa brevemente con sello sobre la placa.

50 16. Añadir 150 µl de "tampón de FACS" y transferir la muestra a tubos de poliestireno de 5 ml y analizar en el instrumento FACS-Canto II de BD (usando el software Diva v. 6.0 de BD).

1.4 Series de concentración para SM101 (concentraciones finales):

55 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,01565, 0,0078, 0,0039, 0,00195 µg/µl;

Volumen final (V_{FINAL}) = 100 µl

1.5 Análisis de datos de FACS

60 Se registraron datos de FACS en un instrumento FACS-Canto II de BD, se guardaron los datos en el formato de archivo fcs. Para el posterior análisis, se usó el software Flow-Jo (v. 8.8.4). La figura 1 representa una estrategia de selección típica.

65 Se seleccionaron y se evaluaron las células viables para determinar su fluorescencia de ficoeritrina. Se agruparon histogramas de muestras de una serie de concentración de SM101 en un solapamiento de histogramas usando el software FlowJo. Se calcularon valores de mediana de fluorescencia mediante el software para cada muestra (figura 2). La figura 2 muestra una fuerte inhibición dependiente de la concentración de la unión de IgG agregadas a FcγRIIB unido a membrana en células Raji. En un experimento paralelo, se sustituyó SM101 por cantidades idénticas de albúmina sérica de pollo usando las mismas series de concentración mencionadas anteriormente para

confirmar la inhibición específica mediante SM101 (figura 3). El método *in vitro* de la invención proporciona un medio cualitativo basado en células para evaluar la actividad de unión de SM101 tal como se demostró mediante el experimento de presentación representado en la figura 2.

5 1.6 Cálculo de la actividad

Para calcular la actividad de SM101 en este ensayo celular, se normalizaron las señales de mediana de intensidad de fluorescencia usando la siguiente fórmula (datos normalizados mostrados en la tabla 1):

10
$$\% \text{ de señal normalizada} = (\text{Señal}_{(\text{SM101 } 0 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l})} - \text{Señal}_{(\text{x})}) / (\text{Señal}_{(\text{SM101 } 0 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l})} - \text{Señal}_{(\text{Ac sec.})})$$

SM101			Mediana	
[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Conc. [M]	nM	Señal	Señal norm.
0	0,00E+00	0,00E+00	3877	0,00%
0,0078	3,90E-07	3,90E+02	3008	23,24%
0,0156	7,80E-07	7,80E+02	2270	42,97%
0,03125	1,56E-06	1,56E+03	1242	70,45%
0,0625	3,13E-06	3,13E+03	466	91,20%
0,125	6,25E-06	6,25E+03	329	94,87%
0,25	1,25E-05	1,25E+04	197	98,40%
0,5	2,50E-05	2,50E+04	238	97,30%
		Ac sec.	137	100,00%

Tabla 1: Valores normalizados calculados para la medición de FACS mostrada en la figura 2, que se usaron para el posterior ajuste de la isoterma de Langmuir.

15

Se realizó un posterior ajuste de los datos a la fórmula de isoterma de unión de Langmuir

$$\% \text{ de inhibición} = (c * \text{inhibición máx.}) / (K_D + c)$$

20

usando la función de complemento Solver en Excel para la determinación de la K_D aparente e inhibición máxima y dio como resultado una curva de inhibición tal como se muestra en la figura 4. La K_D aparente puede diferir de la K_D real, puesto que la concentración en la superficie celular no conocida de $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ en células Raji, así como la concentración de SM101 libre, no pueden tenerse en cuenta. Para el % de inhibición se usaron el % de señal normalizada, c = concentración de FcR soluble (concentración molar o concentración másica). La fórmula se ajusta para determinar la inhibición máx. y K_D usando la función de complemento Solver en Excel o cualquier otro programa informático que permita este tipo de cálculo.

25

Usando esta estrategia de ajuste, los datos de FACS revelaron una K_D aparente de $0,99 \times 10^{-6}$ M con una suma de residuos cuadrados de 0,0226 (tabla 2).

30

SM101	
K_D ap. [M]	$0,99 \times 10^{-6}$
K_A ap. [M^{-1}]	$1,02 \times 10^6$
$R_{\text{máx}}$	107,61%
Residuos	0,0226

Tabla 2: Parámetros obtenidos para el ajuste de los datos de FACS007 a la ecuación de Langmuir.

35

Se usó el software de análisis Microcal™ Origin (versión: 6.0) para calcular la CI_{50} de SM101 a partir de los datos de FACS. Se representó gráficamente el % de inhibición frente a la concentración de SM101 competitivo. Se ajustaron los datos a la función logística sigmoidea:

$$y = A2 + \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$

40

A2: el 100% de inhibición (inhibición máxima)

A1: el 0% de inhibición (inhibición mínima)

x_0 : CI_{50}

45

p: pendiente

El parámetro A1 se estableció en 0 y el parámetro A2 en 100 para el cálculo de CI_{50} .

Usando los datos de la tabla 1 (FACS007), se evaluó una CI_{50} de 17,7 $\mu\text{g/ml}$ con una pendiente de 1,63 (figura 5).

5 1.7 Comparación del patrón de referencia y SM101

En un experimento posterior se evaluó la actividad biológica de la especialidad farmacéutica en investigación SM101 (sFc γ R1IB) y se comparó con el patrón de referencia del principio activo (FACS021). Se llevó a cabo el ensayo de potencia basado en FACS tal como se describe en el punto 1.4 anterior para IMP y patrón de referencia en paralelo sobre una única placa de 96 pocillos.

Se registraron datos de FACS y se analizaron tal como se describe (punto 1.5 anterior) y se realizó ajuste de los datos usando la fórmula de isoterma de unión de Langmuir explicada anteriormente (tabla 3 a continuación y figura 6).

IMP/Patrón de ref. de SM101			Patrón de ref. de SM101		IMP de SM101	
[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Conc. [M]	nM	Mediana		Mediana	
			Señal	Señal norm.	Señal	Señal norm.
0	0,00E+00	0,00E+00	6459	0,00%	6930	0,00%
0,0078	3,90E-07	3,90E+02	5234	19,32%	5309	23,81%
0,0156	7,80E-07	7,80E+02	2326	65,17%	3811	45,81%
0,03125	1,56E-06	1,56E+03	1644	75,92%	1780	75,65%
0,0625	3,13E-06	3,13E+03	921	87,32%	831	89,59%
0,125	6,25E-06	6,25E+03	362	96,14%	478	94,77%
0,25	1,25E-05	1,25E+04	269	97,60%	281	97,66%
0,5	2,50E-05	2,50E+04	182	98,98%	195	98,93%
		Ac sec.	137	100,00%	122	100,00%

Tabla 3: Valores obtenidos a partir de la medición de FACS usados para el ajuste de la isoterma de Langmuir (datos de FACS021).

20 Los datos de FACS revelaron una K_D aparente de $0,739 \times 10^{-6}$ M para el patrón de referencia de SM101 y una K_D aparente de $0,904 \times 10^{-6}$ M para IMP de SM101 (tabla 4).

SM101	Patrón de ref.	IMP
K_D ap. [M]	$0,74 \times 10^{-6}$	$0,90 \times 10^{-6}$
K_A ap. [M^{-1}]	$1,35 \times 10^6$	$1,11 \times 10^6$
$R_{m\acute{a}x}$	105,64	107,21
Residuos	0,05	0,02
CI_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	12,9	16,2

25 Tabla 4: Parámetros obtenidos para el ajuste de la función logística sigmoidea y de Langmuir de los datos de la tabla 3, figura 6 (FACS021).

Se usó el software de análisis Microcal™ Origin (versión: 6.0) para calcular la CI_{50} del patrón de referencia e IMP de SM101 a partir de los datos del análisis de FACS usando la función logística sigmoidea descrita anteriormente. El patrón de referencia de SM101 mostró una CI_{50} de 12,9 $\mu\text{g/ml}$ e IMP de SM101 de 16,2 $\mu\text{g/ml}$ (tabla 4).

Dado que una desviación entre ensayos de +/- 20% es aceptable en un ensayo celular, puede concluirse, por tanto, que la actividad biológica, tal como se determina en el ensayo de potencia basado en FACS, de IMP es comparable con la del patrón de referencia del principio activo de SM101.

35 Ejemplo 2

En este ejemplo se describe un método para la preparación de IgG agregada a partir de una IVIG comercial, Beriglobin. La IgG agregada es una materia prima para el método *in vitro* para determinar la actividad de unión de receptores de Fc gamma humanos solubles de la presente invención. En este experimento se usaron los siguientes reactivos:

Elemento	Proveedor	Calidad
Beriglobin® 160 mg/ml CSL Behring Jeringa precargada de 5 ml	Farmacia local	Aprobación n.º 176a/92
NaCl	Roth, o equivalente	p.a.
KCl	Merck, o equivalente	p.a.
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Sigma, o equivalente	p.a.
KH ₂ PO ₄	Merck, o equivalente	p.a.
NaN ₃	Merck, o equivalente	purificado
Glicerol al 98%, anhidro	Roth, o equivalente	Farm. Eur.

El método para la producción de IgG agregada puede resumirse por las siguientes etapas:

- 5 1. Ajustar Beriglobin® 160 mg/ml a 100 mg/ml con PBS-N.
2. Separar mediante SEC preparativa.
3. Determinar el contenido en proteínas.
- 10 4. *Opcional*: si el contenido es <0,50 mg/ml, concentrar mediante ultrafiltración o si el contenido es >1,40 mg/ml, diluir con PBS-N (solución salina tamponada con fosfato con azida de sodio al 0,02%).
- 15 5. Ajustar con glicerol hasta el 20% (v/v).
6. Tomar alícuotas de 0,5 ml y ultracongelar en nitrógeno líquido.

Específicamente, se mezclan cuidadosamente 5 ml de Beriglobin® 160 mg/ml con 3 ml de PBS-N hasta que se obtiene una disolución homogénea. Se inyectan 3,0 ml de la dilución a una velocidad de flujo de 1 ml/min (Åkta Explorer 10, GE Healthcare) sobre una columna Superdex 200 HiLoad 26/60 (GE Healthcare) equilibrada previamente en PBS-N. Se separan las proteínas a 1 ml/min usando PBS-N como tampón. La IgG agregada eluye tras aproximadamente 115 ml y se recoge en fracciones de 3 ml después de que la densidad óptica del eluato a 280 nm supere 50 mUA. Se agrupan las tres primeras fracciones y se almacenan durante un máximo de 3 días a 2-8°C hasta que se mezclan con la agrupación de ejecuciones de SEC adicionales. Si el contenido en proteínas de la agrupación de IgG agregada de todas las ejecuciones de SEC está por debajo de 0,50 mg/ml, la agrupación ha de concentrarse mediante ultrafiltración hasta 1,00 - 1,40 mg/ml (Amicon Ultra, Ultracel MWCO de 100 kDa, Millipore). Si el contenido en proteínas de la agrupación de IgG agregada está por encima de 1,40 mg/ml, la agrupación se diluye con PBS-N hasta 1,40 mg/ml. Finalmente, se añade el glicerol crioprotector gota a gota con agitación constante (500 rpm) hasta una concentración final del 20% (v/v). Se determina el contenido de la agrupación de Beriglobin® agregado ajustado para la liberación y se toman alícuotas de la agrupación de 0,5 ml en tubos de reacción de 1,5 ml (tubos de sellado seguro, Sarstedt). Se congelan inmediatamente las alícuotas en nitrógeno líquido y se almacenan a de -60°C a -80°C. Los resultados de la purificación se muestran en la figura 7, donde el área sombreada representa las fracciones de IgG agregadas agrupadas.

35 Ejemplo 3

En este ejemplo se describen métodos para someter a prueba la calidad de la IgG agregada preparada según el método del ejemplo 2. En una primera etapa se mide el contenido de las fracciones de Beriglobin® agregado. En una segunda etapa se somete a prueba la pureza del Beriglobin® agregado mediante SEC analítica. La segunda etapa se realiza con alícuotas congeladas del Beriglobin® agregado. Las alícuotas congeladas han de descongelarse a temperatura ambiente (25±2°C) con agitación suave (500 rpm (revoluciones por minuto), Thermomixer R, Eppendorf) antes de su uso.

45 Para minimizar el esfuerzo de las pruebas en caso de un lote incongruente, se realizan por etapas pruebas de calidad. Se realizan las siguientes pruebas en cada etapa de las pruebas:

Etapa	Elemento	N.º de método/plan	Valor objetivo
1	Contenido	Espectroscopía UV/VIS	$0,30 \text{ mg/ml} \leq C_{\text{Beriglobin® agr.}} \leq 1,35 \text{ mg/ml}$
2	Pureza	SEC analítica	área relativa del pico de Beriglobin® agregado/oligomérico >70%

Etapa 1: Medición del contenido mediante espectroscopía UV/VIS

50 El contenido de las fracciones de Beriglobin® agregado producidas según el método del ejemplo 1 puede entonces medirse mediante espectroscopía UV/VIS. Si es necesario, la disolución de proteínas se diluye con el tampón

respectivo para dar una densidad óptica a 280 nm de entre 0,2 y 0,8. Se transfieren 400 µl de la disolución a una microcubeta para UV (microcubeta para UV, Brand). Se registra la absorbancia a 280 nm y 320 nm (Cary 100 Bio, Varian) frente a PBS-N como blanco y se calcula la concentración en mg/ml según la siguiente ecuación:

$$C_{\text{Beriglobin}^{\text{®}} \text{ agr.}} [\text{mg/ml}] = (\text{DO}_{280} - \text{DO}_{320})/1,40$$

Se lleva a cabo el ensayo por triplicado y se calcula el promedio de los resultados.

Etapa 2: Pureza mediante SEC analítica

Se determina la cantidad de Beriglobin[®] agregado/oligomérico en relación con formas diméricas y monoméricas mediante SEC analítica. Se usa un sistema de HPLC serie 1200 (Agilent) equipado con una columna Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare) equilibrada previamente en PBS-N. Se centrifugan 150 µl de una alícuota recién descongelada de Beriglobin[®] agregado (20 000 g, 5 min) y se inyectan 50 µl del sobrenadante a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se separan las proteínas a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min usando PBS-N como tampón y se monitoriza la absorbancia del eluato a 280 nm. El tiempo de ejecución total se limita a 50 min. Cada inyección de Beriglobin[®] agregado va precedida por una inyección de 50 µl de PBS-N, glicerol al 20%. Los cromatogramas se integran manualmente y la pureza se notifica como el área relativa del pico de Beriglobin[®] agregado/oligomérico en comparación con todos los picos desde 13,0 min hasta 30,0 min. Se muestra SEC analítica de diversas fracciones de Beriglobin[®] en la figura 8. Las figuras 9a y 9b muestran la integración a modo de ejemplo de cromatogramas de SEC analítica de dos lotes de Beriglobin[®] agregado.

Ejemplo 4

En este ejemplo se llevaron a cabo experimentos para determinar una posible influencia de la cantidad y calidad de Beriglobin[®] agregado sobre la unión a células Raji. Los experimentos se llevaron a cabo usando cantidades variables de Beriglobin[®] agregado y diferentes lotes de Beriglobin.

Las concentraciones sometidas a prueba de Beriglobin[®] agr. comprendían 20, 10, 5, 3 y 2,5 µg/1x10⁵ células. En experimentos posteriores se varió de manera concomitante la concentración de anticuerpo secundario (αhu IgG(H+L)-PE) para determinar si el anticuerpo secundario estaba disponible en exceso en comparación con Beriglobin[®] agr. (figura 10).

Tal como puede observarse a partir de la figura 10, la unión a células Raji no está limitada por la cantidad de Beriglobin[®] agregado, incluso a la concentración más baja. Una cantidad de 2,5 µg por 1x10⁵ células (V_{final} = 100 µl) es suficiente para una unión cuantitativa a los receptores disponibles en las células.

La tabla 5 muestra la mediana de IMF de diferentes lotes de Beriglobin[®] agr. (n.º 1, 2, 3), la media y la DE calculadas

	Mediana de IMF	Mediana de IMF
n.º de lote de Beriglobin agr.	2,5 µg/µl	5,0 µg/µl
1	1353	1234
2	1498	1145
3	1001	960
Media	1284	1113
DE	256	140

Ejemplo 5

En este experimento se investigó la dependencia del pH de la unión de Beriglobin[®] agregado a células Raji. El medio usado para el método de la invención tal como se describe en ejemplo 1 (ensayo de potencia de FACS) contiene RPMI, MEM, piruvato de Na, FSC al 10% y una fuente de L-glutamina (Glutamax-I, Gibco). La L-glutamina se degrada a lo largo del tiempo a PCA y NH₃, lo que conduce a un pH alcalino. Aunque Glutamax-I tiene una tendencia a la degradación reducida, el pH del medio de cultivo se vuelve más alcalino a lo largo del tiempo. Para someter a prueba la dependencia del pH de la unión de Beriglobin[®] agregado a células Raji, se incubaron 0,1E6 células Raji con 2,5 µg de Beriglobin[®] agr. a diversas condiciones de pH (pH 6,5, 6,7, 7,0, 7,2, 7,8, 8,0, 8,5, 9,0, 10,0) y se evaluó la unión Beriglobin[®] agr. a células en un ensayo de FACS usando un anticuerpo secundario αhu IgG(H+L)-PE 1/200. Tal como puede observarse a partir de las figuras 11(a) y 11(b), hay una dependencia de la unión de Beriglobin[®] agregado a células Raji con un óptimo evidente a pH 6,5 de las condiciones de pH sometidas a prueba. No se sometieron a prueba condiciones de pH inferior, puesto que se espera un efecto perjudicial sobre las células. Por tanto, debe garantizarse que sólo se usa medio nuevo con un pH a 7,0 ± 0,25 para las pruebas. Se prefiere usar tampón de FACS (HBSS + FCS al 5% + azida de sodio al 0,01% (p/v), pH 6,5 – 6,8) en lugar de medio TM como diluyente en el ensayo.

Ejemplo 6

5 Se sometió a prueba el efecto de IgG monomérica humana sobre la inhibición competitiva de la unión de IC a células
 positivas para Fc γ RIIB mediante SM101 en experimentos adicionales. Con este propósito, se incubaron células Raji
 o bien con una cantidad establecida de Beriglobin® agregado (2,5 μ g/1x10⁵ células) junto con una cantidad
 establecida de Beriglobin® monomérico y cantidades variables de SM101 (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78,
 0,39 μ M) o bien con una cantidad establecida de Beriglobin® agregado y SM101 y cantidades variables de
 Beriglobin® monomérico (3,3, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0 μ M). Se añadió anticuerpo secundario en exceso
 10 (dilución 1/100 de solución madre, se añadieron 20 μ l a 1980 μ l, concentración de proteínas de Ac sec.: 0,5 μ g/ μ l,
 igual a 0,25 μ g/1x10⁵). Se encontró que Beriglobin® monomérico inhibe de manera competitiva la unión de
 inmunocomplejos a células Raji en un intervalo de concentración de nM. SM101 muestra el mismo efecto. aunque
 en un intervalo de concentración de μ M. Puede concluirse que Beriglobin® monomérico se une a Fc γ RIIB unido a la
 membrana, inhibiendo así la unión de Beriglobin agregado. No se conoce el número de moléculas de Beriglobin®
 agregadas y activas en el sistema, por tanto, no está claro si el efecto observado se debe a una unión preferente de
 15 IgG monomérica a Fc γ RIIB unido a la membrana o se debe a un exceso de Beriglobin® agregado por IgG
 monomérica añadida. La concentración más alta de IgG monomérica (3,3 μ M) corresponde a 0,5 μ g/1x10⁵ células, lo
 que hace poco probable que la IgG monomérica se una a todo el anticuerpo secundario disponible.

Ejemplo 7

20 En este experimento se sometió a prueba la reproducibilidad dentro del ensayo y entre ensayos respecto a IMF de
 fondo de anticuerpo secundario. En un análisis retrospectivo se evaluaron los datos de n = 25 pruebas para
 determinar las variaciones en la tinción de fondo de anticuerpo secundario en células Raji. En la tabla 7 a
 continuación se muestran la IMF de células Raji teñidas con anticuerpo secundario anti-IgG(H+L)-PE humana
 25 (dilución 1/100), el valor medio de las muestras y la desviación estándar. Los colores indican experimentos que se
 ejecutaron en paralelo (estabilidad dentro del ensayo).

	IMF	
FACS005	172	
FACS006	162	
FACS007	137	
FACS017	186	
FACS018	153	
FACS020	130	
FACS021	117	
FACS022	170	
FACS023I	118	
FACS023II	130	
FACS024I	98,5	
FACS024II	113	
FACS024III	109	
FACS024IV	114	
FACS025I	101	
FACS025II	97,7	
FACS026I	114	
FACS026II	131	
FACS027I	133	
FACS027II	114	
FACS027III	121	
FACS027IV	127	
FACS028	208	
FACS029	178	
FACS031	139	
	Media	134,9
	DE	29

5 Tal como puede observarse a partir de la tabla 6, la IMF de células Raji teñidas con anticuerpo secundario (sin Beriglobin agregado añadido) permanece bastante constante cuando se comparan o bien experimentos distintos (estabilidad entre ensayos) o bien experimentos paralelos (estabilidad dentro del ensayo) con una desviación estándar (DE) del 21% (DE de IMF 29, media de IMF 134,9).

Ejemplo 8

En este ejemplo se sometió a prueba la reproducibilidad dentro del ensayo y entre ensayos respecto a K_D aparente y Cl_{50} . Para evaluar la estabilidad dentro del ensayo y entre ensayos del ensayo de potencia basado en FACS, se analizaron conjuntos de datos de 25 experimentos para la K_D aparente y Cl_{50} ajustadas. En la tabla 7 a continuación se muestra la K_D , Cl_{50} y densidad celular de células Raji antes de la recogida de 25 experimentos de FACS. Los experimentos 12-15 y 16-17 representan la estabilidad dentro del ensayo, puesto que K_D y Cl_{50} se evaluaron en pruebas distintas en una única placa. Las pruebas n.º 4 y 6 (resaltadas en gris) se han excluido del análisis posterior, puesto que los datos medidos estaban mostrando resultados atípicos obvios.

Prueba n.º	FACS	$K_D [10^{-6} M]$	Cl_{50}	densidad celular
1	FACS005	0.75	13.40	3.0E+05
2	FACS006	0.46	7.54	3.6E+05
3	FACS007	0.98	17.77	2.4E+05
4	FACS017	2.24	41.63	7.4E+05
5	FACS018	0.82	14.68	2.2E+05
6	FACS019	3.26	25.33	3.4E+05
7	FACS020	0.66	12.96	2.2E+05
8	FACS021	0.74	13.96	1.8E+05
9	FACS022	0.18	4.03	5.0E+05
10	FACS023	0.64	12.03	1.0E+06
11	FACS023	0.60	10.76	1.0E+06
12	FACS024I	0.66	15.99	5.4E+05
13	FACS024II	0.66	13.84	5.4E+05
14	FACS024III	0.79	15.05	5.4E+05
15	FACS024IV	0.89	16.72	5.4E+05
16	FACS025I	0.45	12.196	5.0E+05
17	FACS025II	0.90	14.05	5.0E+05
18	FACS026	0.22	nD.	2.6E+05
19	FACS027	0.34	6.84	5.2E+05
20	FACS028	0.15	2.61	6.6E+05
21	FACS029	0.20	3.82	2.4E+05
22	FACS031	0.29	7.72	6.0E+05
23	FACS032	0.32	6.75	3.0E+05
24	FACS034	0.32	6.42	3.4E+05
25	FACS039	0.24	4.85	4.0E+05

Tal como puede concluirse a partir de los datos mostrados en la tabla 7, la estabilidad dentro del ensayo y entre ensayos es alta. No obstante, ha de indicarse que, a partir de la prueba n.º 18, se determinaron valores de K_D y Cl_{50} mucho menores. Esto se correlaciona con una nueva configuración de nivel inicial de la máquina FACS-Canto II.

	$K_D [10^{-6} M]$	$Cl_{50} [\mu g/ml]$
Media	0,53	10,6
DE	0,26	4,7
D media	0,25	4,1

Tabla 8: Valor medio, desviación estándar y desviación media de K_D y Cl_{50} de 25 experimentos de la tabla 8.

La tabla 8 representa el valor medio para la K_D ($0,53 \times 10^{-6} M$) y Cl_{50} ($10,6 \mu g/ml$) de los 25 experimentos mostrados en la tabla 7. Esto conduce a una DE de aproximadamente el 50% ($DE = 0,26$). Si se calcula la media por separado para las pruebas n.º 1 - 17 (excluyendo los resultados atípicos obvios n.º 4 y 6) y n.º 18 - 25, la DE es

ES 2 687 716 T3

considerablemente menor del 29% para las pruebas n.º 1 - 17 (con una K_D media de $0,68 \times 10^{-6}$ M), y del 26% para las pruebas n.º 18 - 25 (con una K_D media de $0,26 \times 10^{-6}$ M) (tabla 9).

Pruebas	N.º 1-17	N.º 18-25
	K_D [10^{-6} M]	CI_{50} [$\mu\text{g/ml}$]
Media	0,68	0,26
DE	0,2	0,07

5 Tabla 9: Valores de K_D y CI_{50} medios de las pruebas n.º 1 - 17 y n.º 18 - 25.

Lista de secuencias

- 10 <110> Supremol GmbH
- <120> Método *in vitro* para determinar la estabilidad de composiciones que comprenden receptor(es) de Fc gamma soluble(s)
- 15 <130> Documento SUP14702PCT
- <150> Documento EP 13003835.9
- <151> 01-08-2013
- 20 <160> 10
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 177
- 25 <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- <223> receptor de Fc gamma soluble IIB
- 30 <400> 1

ES 2 687 716 T3

Met Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn
1 5 10 15

Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser
20 25 30

Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro
35 40 45

Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser
50 55 60

Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val
65 70 75 80

His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu
85 90 95

Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys
100 105 110

Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys
115 120 125

Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His
130 135 140
Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu
145 150 155 160

Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser
165 170 175

Pro

5 <210> 2
<211> 534
<212> ADN
<213> artificial

10 <220>
<223> receptor de Fc gamma soluble IIB

<400> 2

ES 2 687 716 T3

```

atggcaccgc cgaaagcagt tctgaaactg gaaccgcagt ggattaacgt tctgcaggaa      60
gatagcgтта ccctgacctg tcgtggcacc catagcccgg aaagcgatag cattcagtgg      120
tttcacaacg gcaatctgat tccgacctat acccagccga gctatcgттt taaagcgaac      180
aacaacgata gcggcgaata tacctgtcag accggtcaga ccagcctgag cgatccggтт      240
catctgacctg ttctgagcga atggctggтт ctgcagacct cgcatctgga atttcaggaa      300
ggcgaaacca ttgttctgcg ttgccacagc tggaagata aaccgctggт taaagттacc      360
ttcttccaga acggcaaaag caaaaaattc agccgtagcg atccgaattt tagcattccg      420
caggcgaatc atagccatag cggcgattat cattgtacct gcaacattgg ctataccctg      480
tatagcagca aaccggtgac cattaccgтт caggcgccga gcagcagccc gtaa          534

```

```

<210> 3
<211> 181
5 <212> PRT
  <213> humano

```

```

10 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(181)
    <223> RIIB de Fc gamma humano

```

```
<400> 3
```

```

Met Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro
 1           5           10           15

```

```

Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg
          20           25           30

```

```

15 Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly
          35           40           45

```

ES 2 687 716 T3

Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn
 50 55 60

Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu
 65 70 75 80

Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln
 85 90 95

Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys
 100 105 110

His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn
 115 120 125

Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro
 130 135 140

Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile
 145 150 155 160

Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala
 165 170 175

Pro Ser Ser Ser Pro
 180

<210> 4
 <211> 543
 5 <212> ADN
 <213> humano

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(5443)
 <223> RIIIB de Fc gamma humano

<400> 4

atggggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaaac tcgagcccca gtggatcaac 60
 gtgctccagg aggactctgt gactctgaca tgccggggga ctcacagccc tgagagcgac 120
 tccattcagt ggttccacaa tgggaatctc attcccaccc acacgcagcc cagctacagg 180
 ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc 240
 agcgaccctg tgcactctgac tgtgctttct gagtggctgg tgctccagac ccctcacctg 300
 gagttccagg agggagaaac catcgtgctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg 360
 15 gtcaagggtca cattcttcca gaatggaaaa tccaagaaat tttcccgttc ggatcccaac 420

ES 2 687 716 T3

ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac agtgggtgatt accactgcac aggaaacata 480
 ggctacacgc tgtactcatc caagcctgtg accatcactg tccaagctcc cagctcttca 540
 ccg 543

<210> 5
 <211> 184
 5 <212> PRT
 <213> humano
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(184)
 <223> RIIA de Fc gamma humano
 <400> 5

Met Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro
 1 5 10 15
 Pro Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln
 20 25 30
 Gly Ala Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly
 35 40 45
 Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn
 50 55 60
 Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu
 65 70 75 80
 Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln
 85 90 95
 Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys
 100 105 110
 His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn
 115 120 125
 Gly Lys Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro
 130 135 140
 Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile
 145 150 155 160
 Gly Tyr Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val
 165 170 175
 15 Pro Ser Met Gly Ser Ser Ser Pro
 180

ES 2 687 716 T3

<210> 6
 <211> 554
 <212> ADN
 5 <213> humano

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(554)
 10 <223> RIIA de Fc gamma humano

 <400> 6

 atggggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaaac ttgagcccc gtggatcaac 60
 gtgctccagg aggactctgt gactctgaca tgccaggggg ctgcagccc tgagagcgac 120
 tccattcagt ggttccacaa tgggaatctc attcccaccc acacgcagcc cagctacagg 180
 ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc 240
 agcgaccctg tgcactctgac tgtgctttcc gaatggctgg tgctccagac ccctcacctg 300
 gagttccagg agggagaaaac catcatgctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg 360
 gtcaagggtca cattcttcca gaatggaaaa tcccagaaat tctcccattt ggatcccacc 420
 ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac agtggtgatt accactgcac aggaaacata 480
 ggctacacgc tgttctcatc caagcctgtg accatcactg tccaagtgcc cagcatgggc 540
 agctctttcac caat 554

15 <210> 7
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> humano
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(182)
 <223> RIIIA de Fc gamma humano
 25 <400> 7

 Met Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg
 1 5 10 15

 Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser
 20 25 30

 Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser
 35 40 45

ES 2 687 716 T3

Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser
50 55 60

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val
65 70 75 80

Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp
85 90 95

Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys
100 105 110

Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg
115 120 125

Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu
130 135 140

Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn
145 150 155 160

Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ser Val
165 170 175

Ser Thr Ile Ser Ser Phe
180

<210> 8
<211> 546
5 <212> ADN
<213> humano

<220>
10 <221> humano
<222> (1)..(546)
<223> RIIIA de Fc gamma humano

<400> 8

atggatctcc caaaggctgt ggtgttcctg gagcctcaat ggtacagggt gctcgagaag 60
gacagtgtga ctctgaagtg ccaggagacc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg 120
tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca 180
gttgacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgaccgggtg 240
cagctagaag tccatatcgg ctggctgttg ctccaggccc ctcggtgggt gttcaaggag 300
gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca taaggtcaca 360
15 tatttacaga atggcaaag caggaagtat tttcatcata attctgactt ctacattcca 420

ES 2 687 716 T3

aaagccacac tcaaagacag cggctcctac ttctgcaggg ggcttggtgg gagtaaaaat 480

gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaagggtt tgtcagtgtc aaccatctca 540

tcattc 546

<210> 9

<211> 182

5 <212> PRT

<213> humano

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(182)

<223> RIIIB de Fc gamma humano

<400> 9

Met Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Ser
1 5 10 15

Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser
20 25 30

Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Asn Leu Ile Ser
35 40 45

Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asn Asp Ser
50 55 60

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val
65 70 75 80

Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp
85 90 95

Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys
100 105 110

Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Asp Arg
115 120 125

Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro Lys Ala Thr Leu
130 135 140

Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn
145 150 155 160

15 Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val
165 170 175
Ser Thr Ile Ser Ser Phe
180

ES 2 687 716 T3

<210> 10
 <211> 486
 <212> ADN
 5 <213> humano

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(486)
 10 <223> RIIIB de Fc gamma humano

 <400> 10

 gacagtgtga ctctgaagtg ccaggagacc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg 60
 tttcacaatg agaacctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca 120
 gtcaacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgaccggtg 180
 cagctagaag tccatatcgg ctggctgttg ctccaggccc ctcggtgggt gttcaaggag 240
 gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca taaggtcaca 300
 tatttacaga atggcaaaga caggaagtat tttcatcata attctgactt ccacattcca 360
 aaagccacac tcaaagatag cggctcctac ttctgcaggg ggcttggttg gagtaaaaat 420
 gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaagggt tggcagtgtc aaccatctca 480
 tcattc 486
 15

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para determinar la estabilidad de una composición que comprende o consiste esencialmente en receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (a) poner en contacto una superficie que comprende receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB con una cantidad establecida de IgG humana agregada;
 - (b) poner en contacto dicha superficie que comprende receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB con una cantidad establecida de dicha composición de receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB; y
 - (c) determinar la cantidad de IgG humana agregada que se une a dicha superficie que comprende dicho receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB,
 - (d) y comparar la cantidad de IgG humana agregada que se une a dicha superficie tal como se determina en la etapa (c) con un valor de referencia y determinar de ese modo la estabilidad de dicha composición que comprende o consiste esencialmente en receptor de Fc gamma humano soluble IIA, IIB, IIIA y/o IIIB.
2. Método según la reivindicación 1, en el que las etapas (a) y (b) se llevan a cabo de manera concomitante o consecutiva.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha superficie que comprende receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB es o comprende una célula o línea celular de mamífero, y/o una superficie sólida que puede recubrirse con receptor de Fc gamma humano IIA, IIB, IIIA y/o IIIB.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha IgG humana agregada es una IgG humana agregada que puede aislarse a partir de proteína humana que se caracteriza por un contenido de al menos el 90% de IgG humana.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha IgG humana agregada puede aislarse a partir de Beriglobin.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha IgG humana agregada es una IgG humana agregada que puede obtenerse a partir de proteína humana mediante un método de aislamiento que comprende cromatografía de exclusión molecular.
7. Método según la reivindicación 6, en el que dicha cromatografía de exclusión molecular separa IgG monomérica y/o dimérica de dicha IgG agregada.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha IgG humana agregada está marcada.
9. Método según la reivindicación 8, en el que dicho marcador comprende un anticuerpo secundario marcado anti-IgG humana.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho receptor de Fc gamma humano soluble es un receptor IIB de Fc gamma soluble.
11. Método según la reivindicación 10, en el que dicho receptor IIB de Fc gamma humano soluble es SM101 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en el que dicha célula de mamífero es una célula Raji.
13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el subtipo del receptor de Fc gamma humano comprendido en dicha superficie y el subtipo del receptor de Fc gamma humano comprendido en dicha preparación de receptor de Fc gamma humano soluble son idénticos.

Estrategia de selección para análisis de FACS

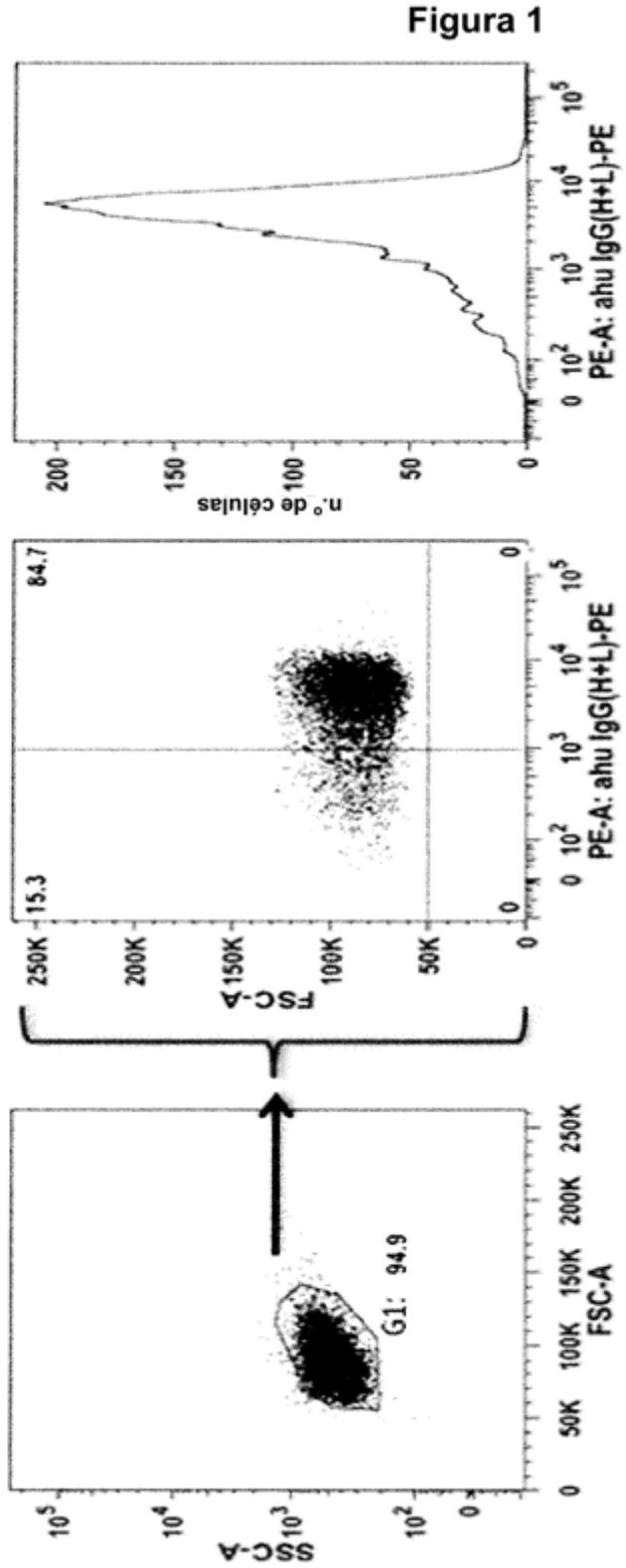


Figura 1

Figura 2

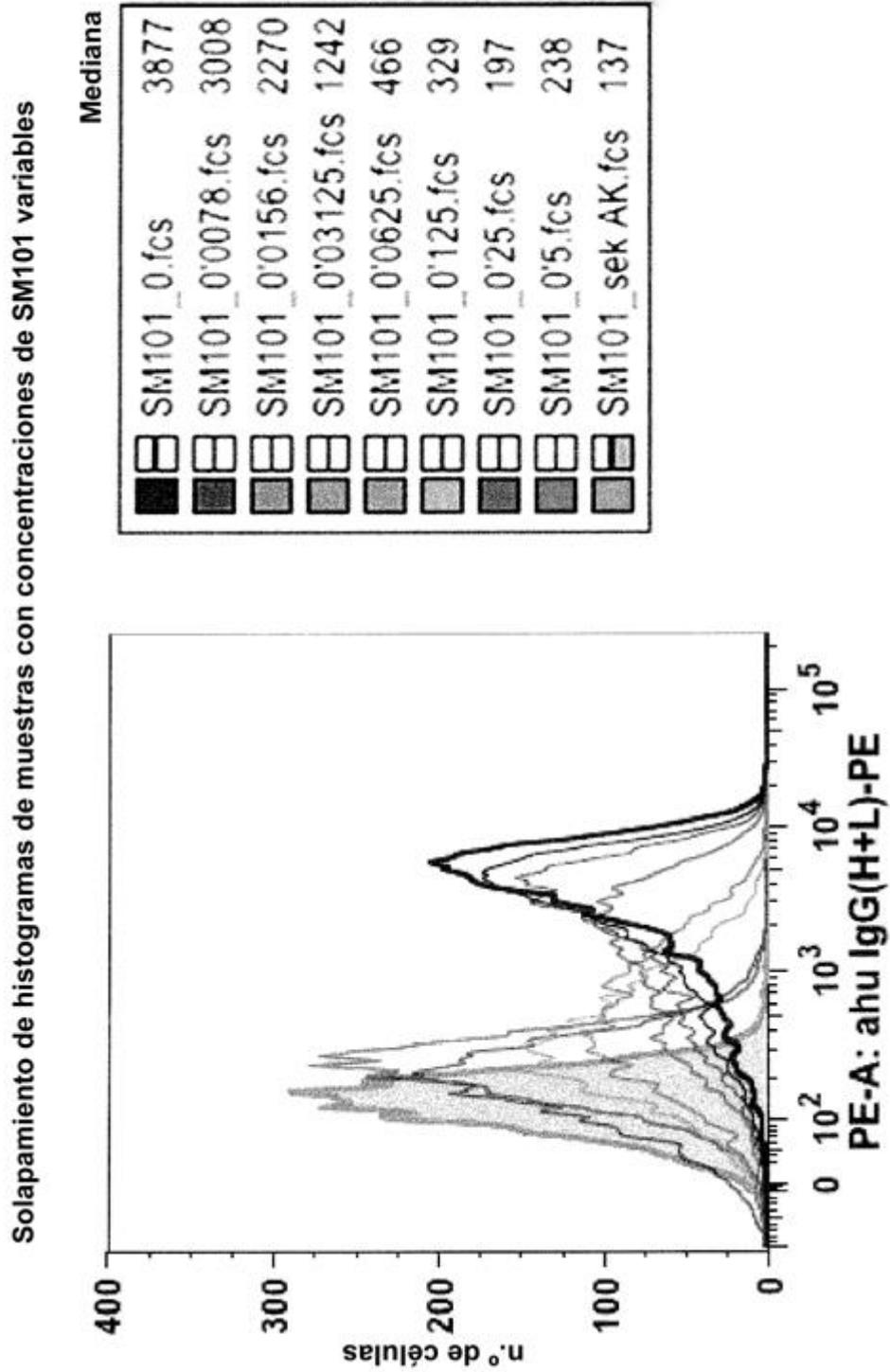
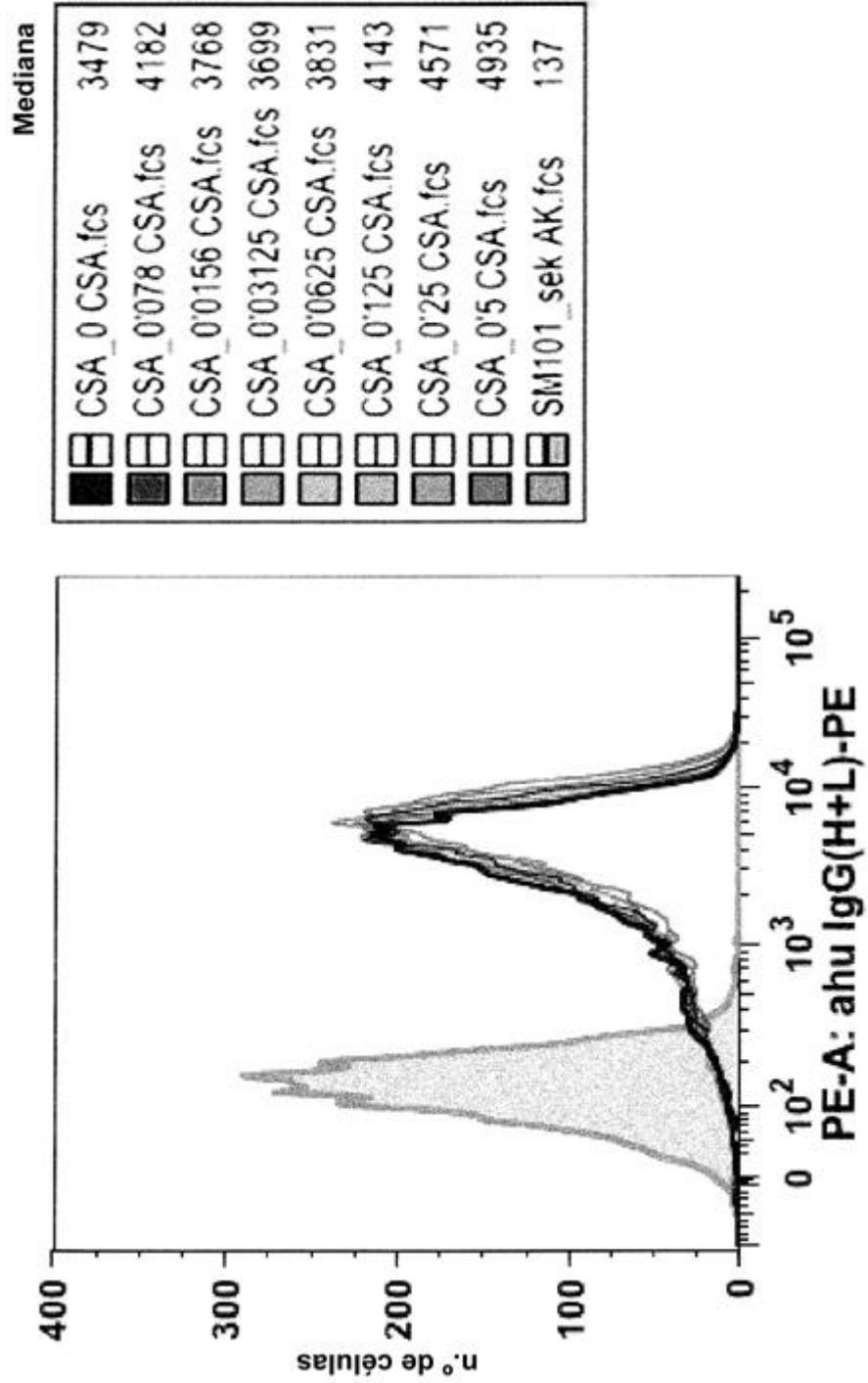


Figura 3

Solapamiento de experimento de control usando albúmina sérica de pollo



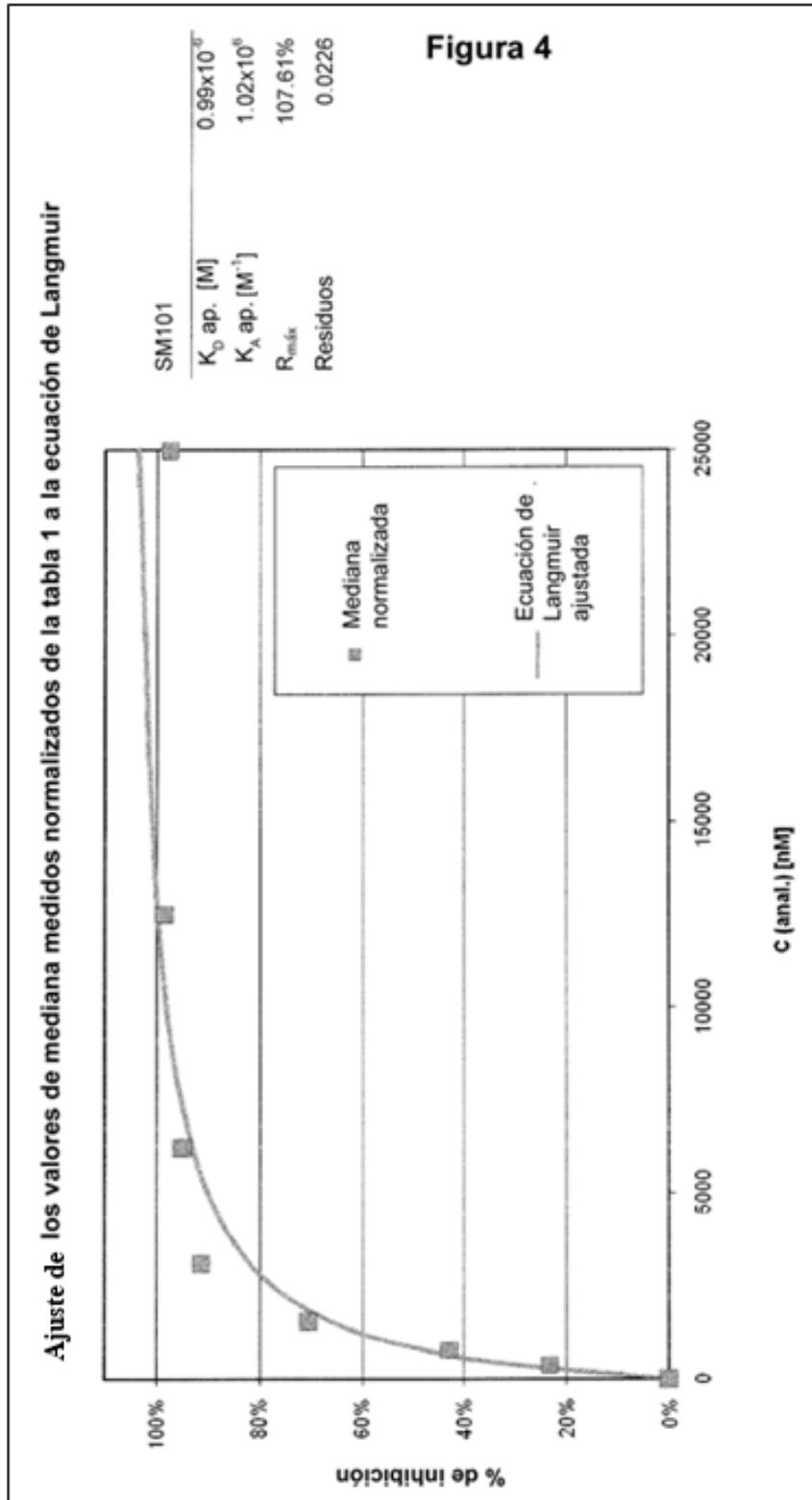


Figura 5

Datos ajustados a la función logística sigmoide que muestran el % de inhibición frente a la concentración másica de SM101

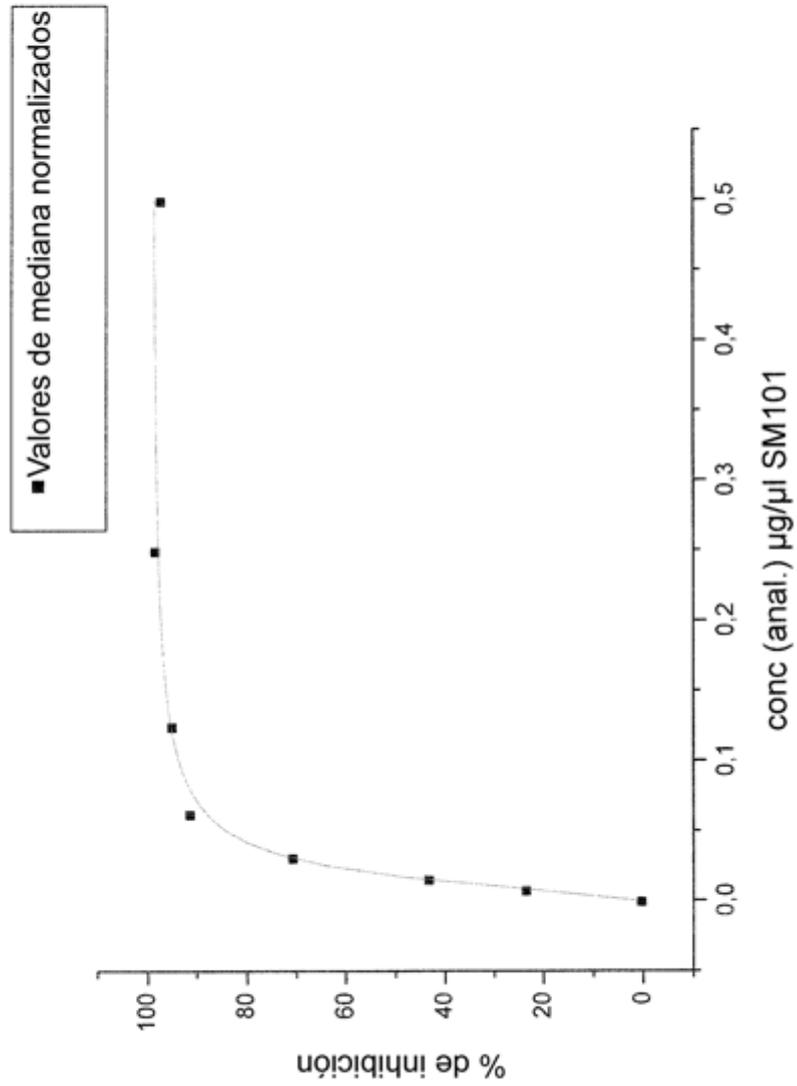


Diagrama de Langmuir de datos ajustados a los valores de mediana medidos normalizados de referencia y SM101

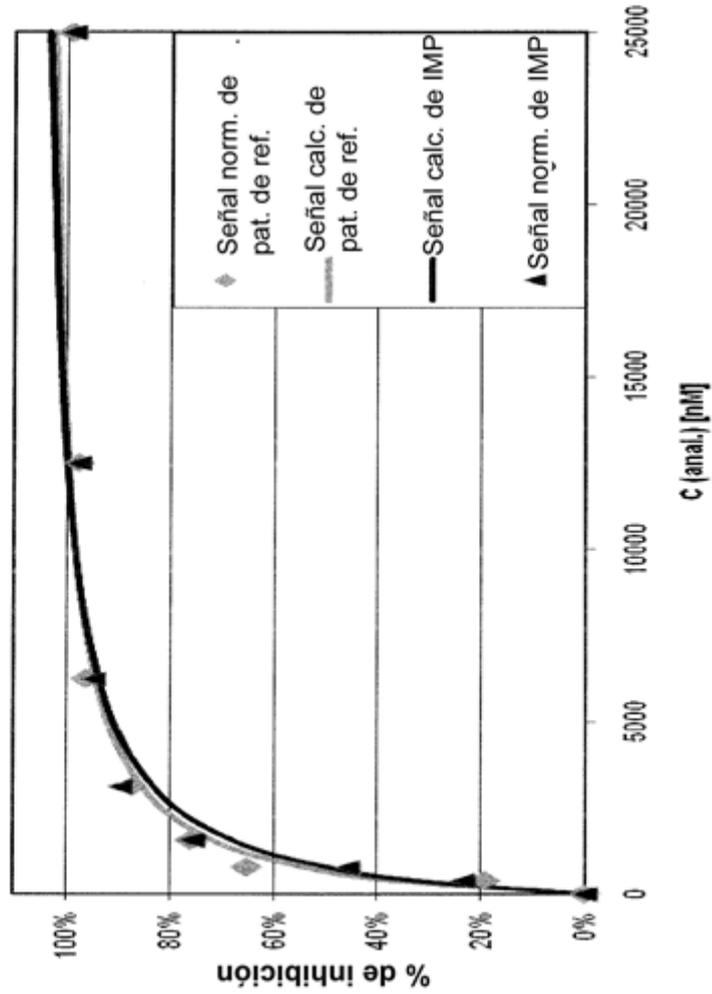


Figura 6

SM101	Pat. de ref.	IMP
K_D ap. [M]	0.74×10^{-5}	0.90×10^{-5}
K_A ap [M ⁻¹]	1.35×10^5	1.11×10^5
$R_{máx}$	105.64	107.21
Residuos	0.05	0.02
CI_{50} [µg/ml]	12.9	16.2

Figura 7

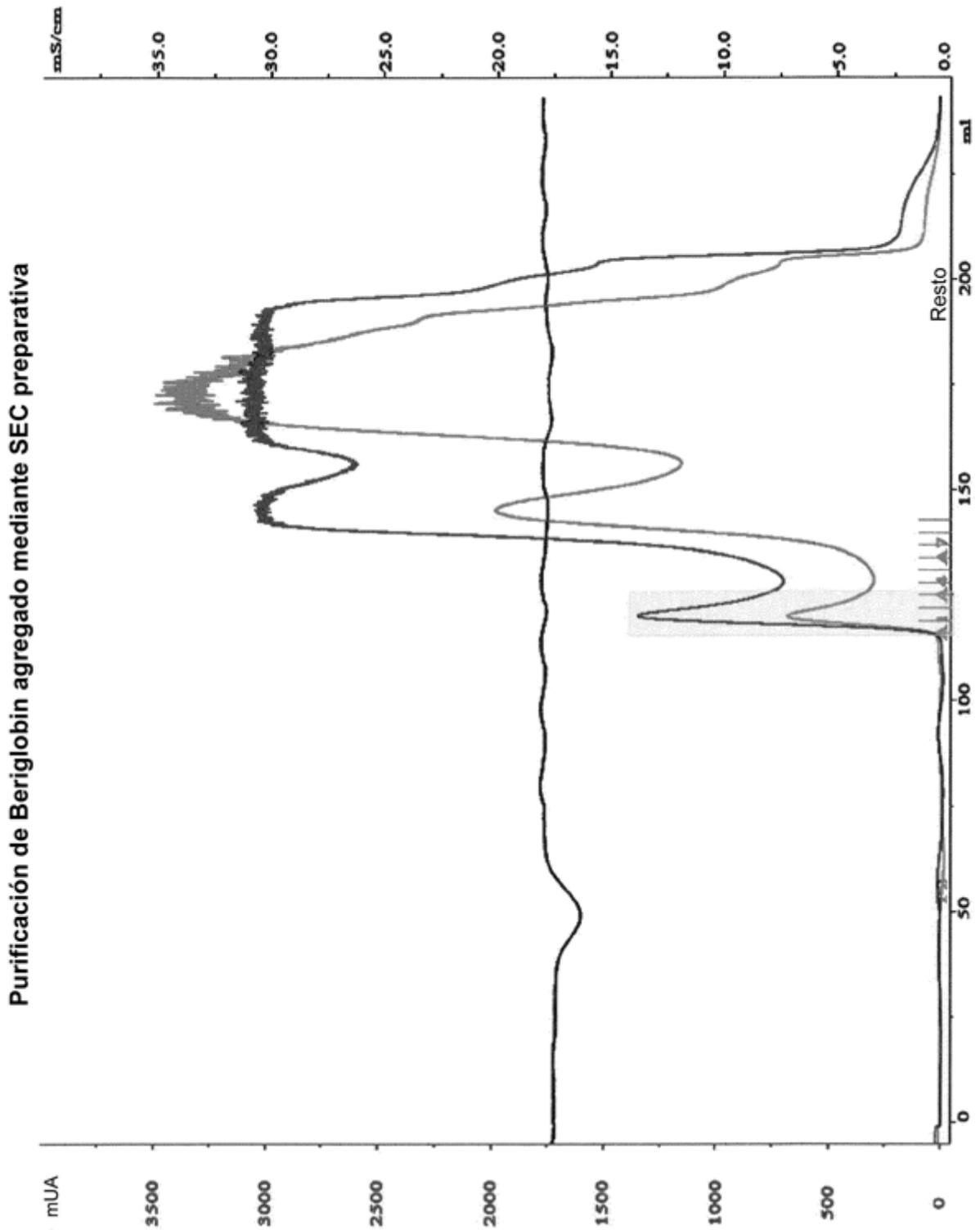


Figura 8

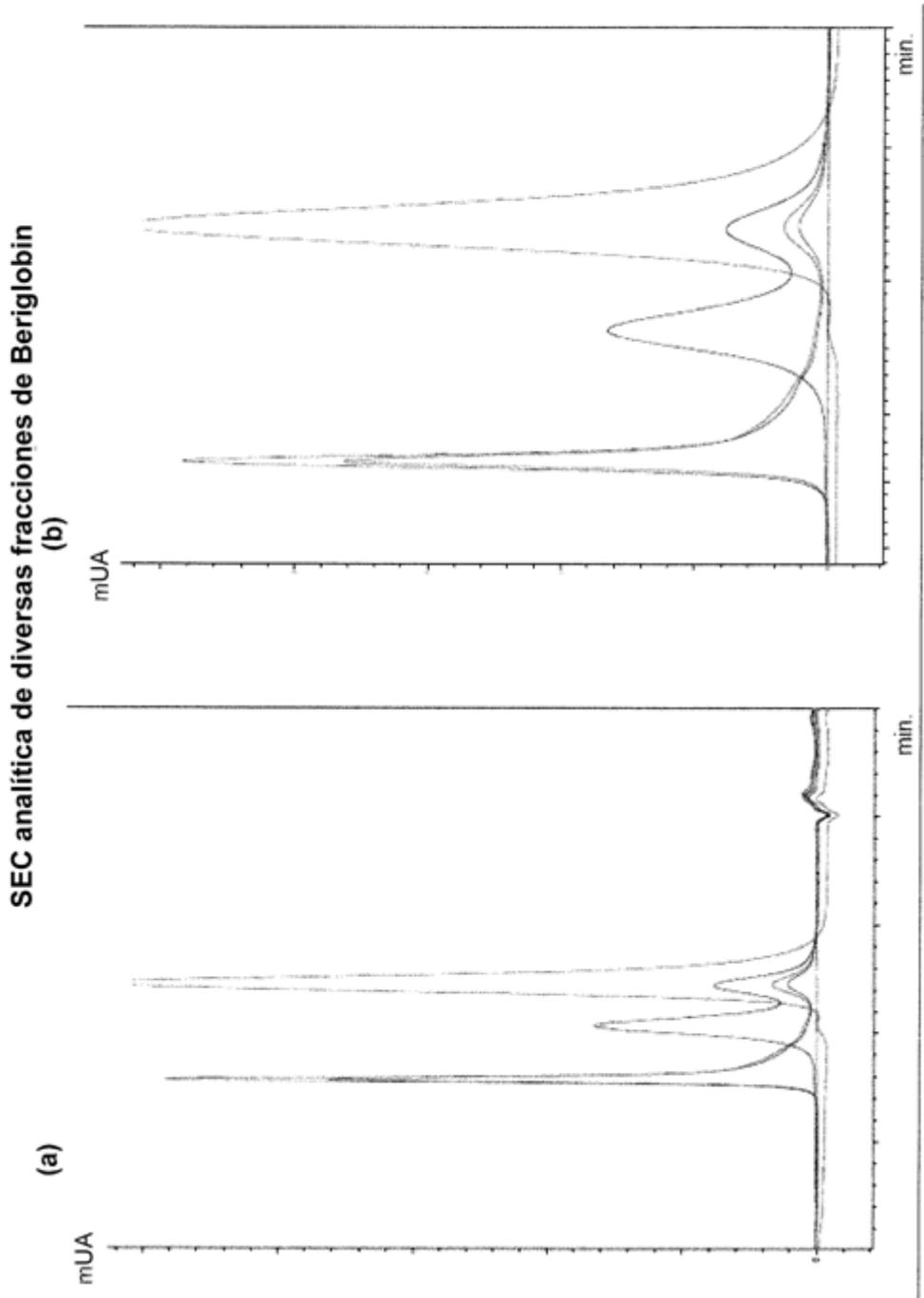
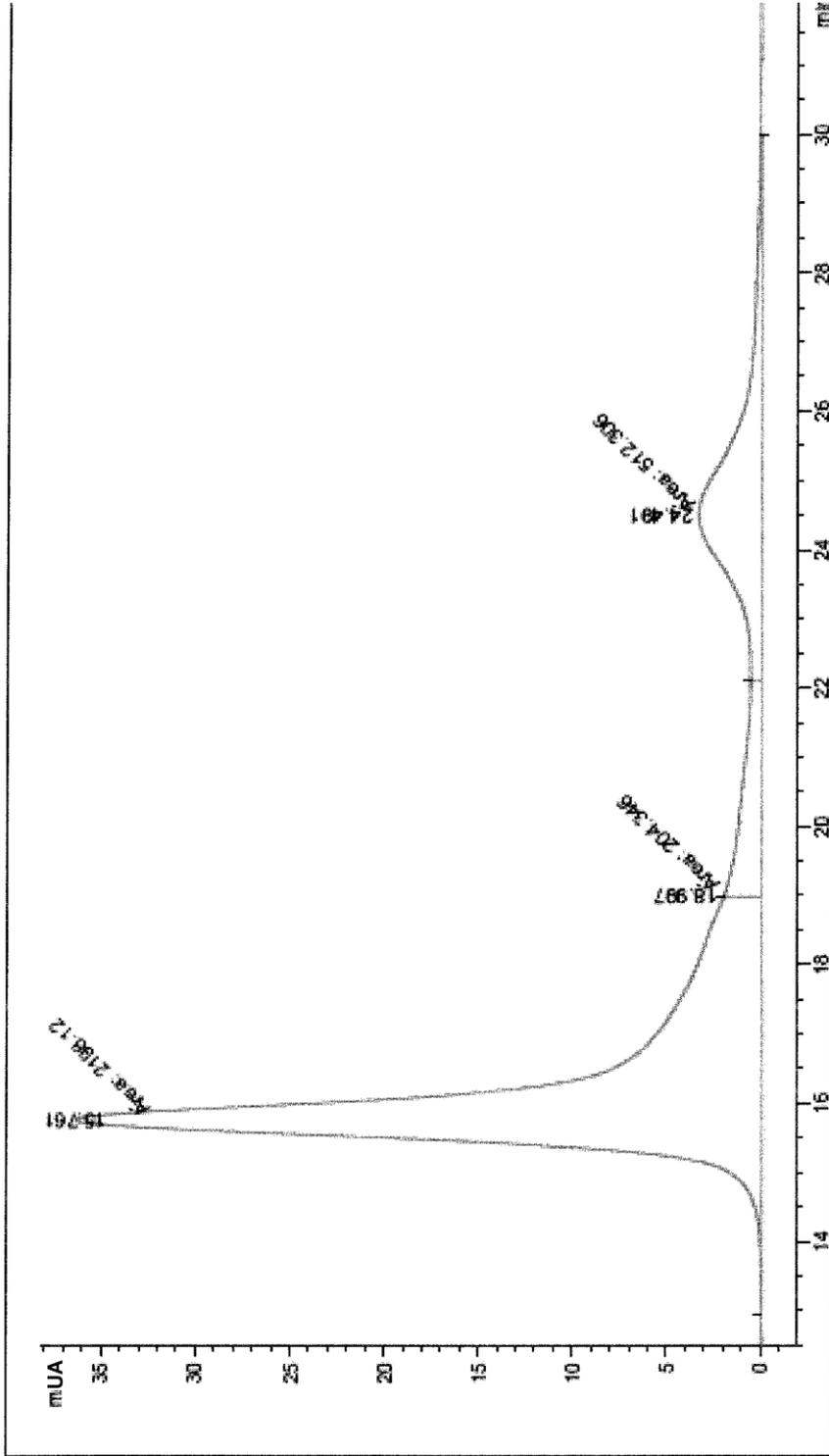
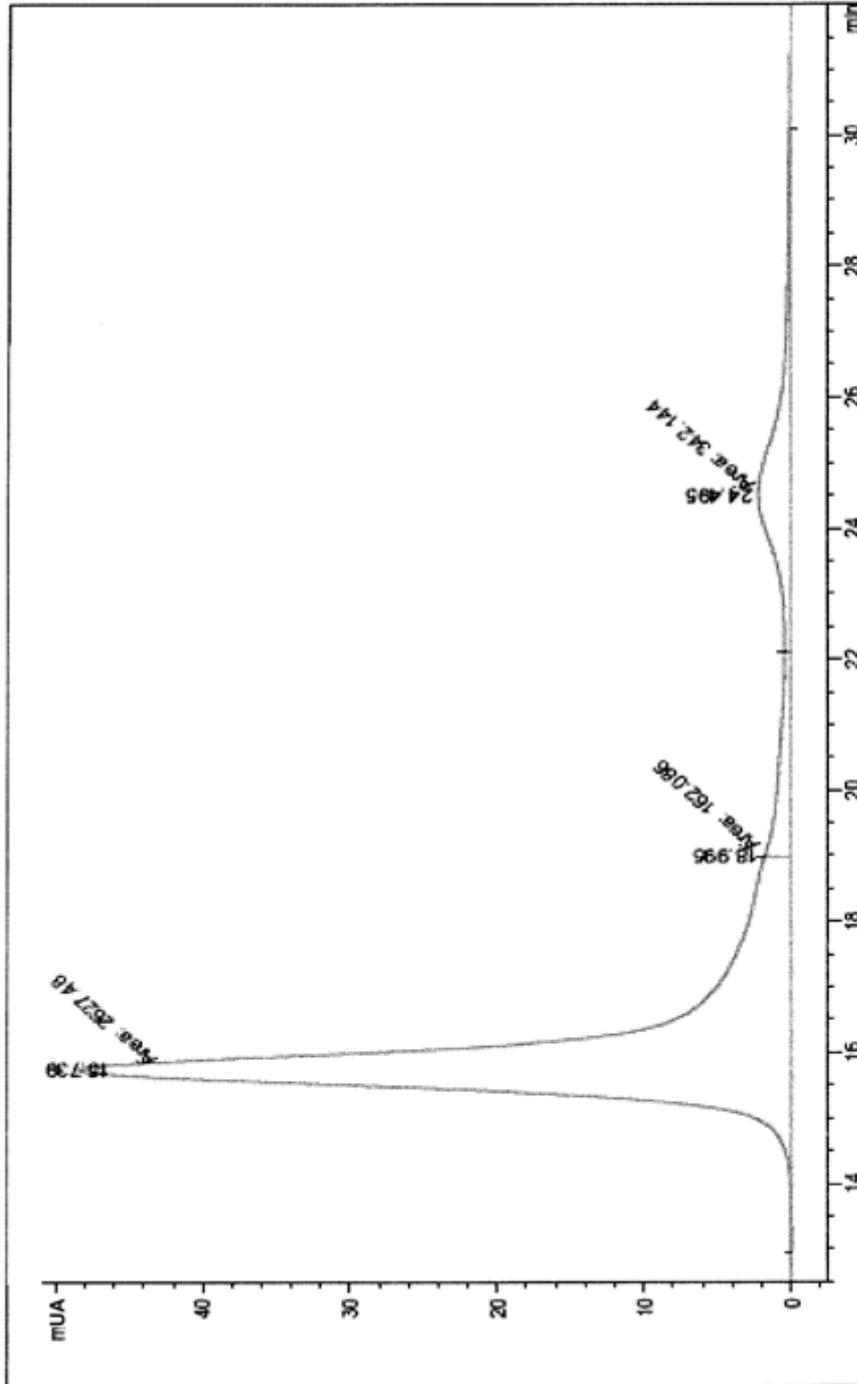


Figura 9a



Especies de Beriglobin	tiempo de retención de pico [min]	Área, absoluta [m UA·s]	Área, relativa [%]
agregado / oligomérico	15.8	2198	75.4
dimérico	n.a.	204	7.0
monomérico	24.5	512	17.6

Figura 9b



Especies de Beriglobin	tiempo de retención de pico [min]	Área, absoluta [m UA·s]	Área, relativa [%]
agregado / oligomérico	15.7	2627	83.9
dimérico	n.a.	162	5.2
monomérico	24.5	342	10.9

Análisis de FACS de diferentes lotes y cantidades variables de Beriglobin agregado

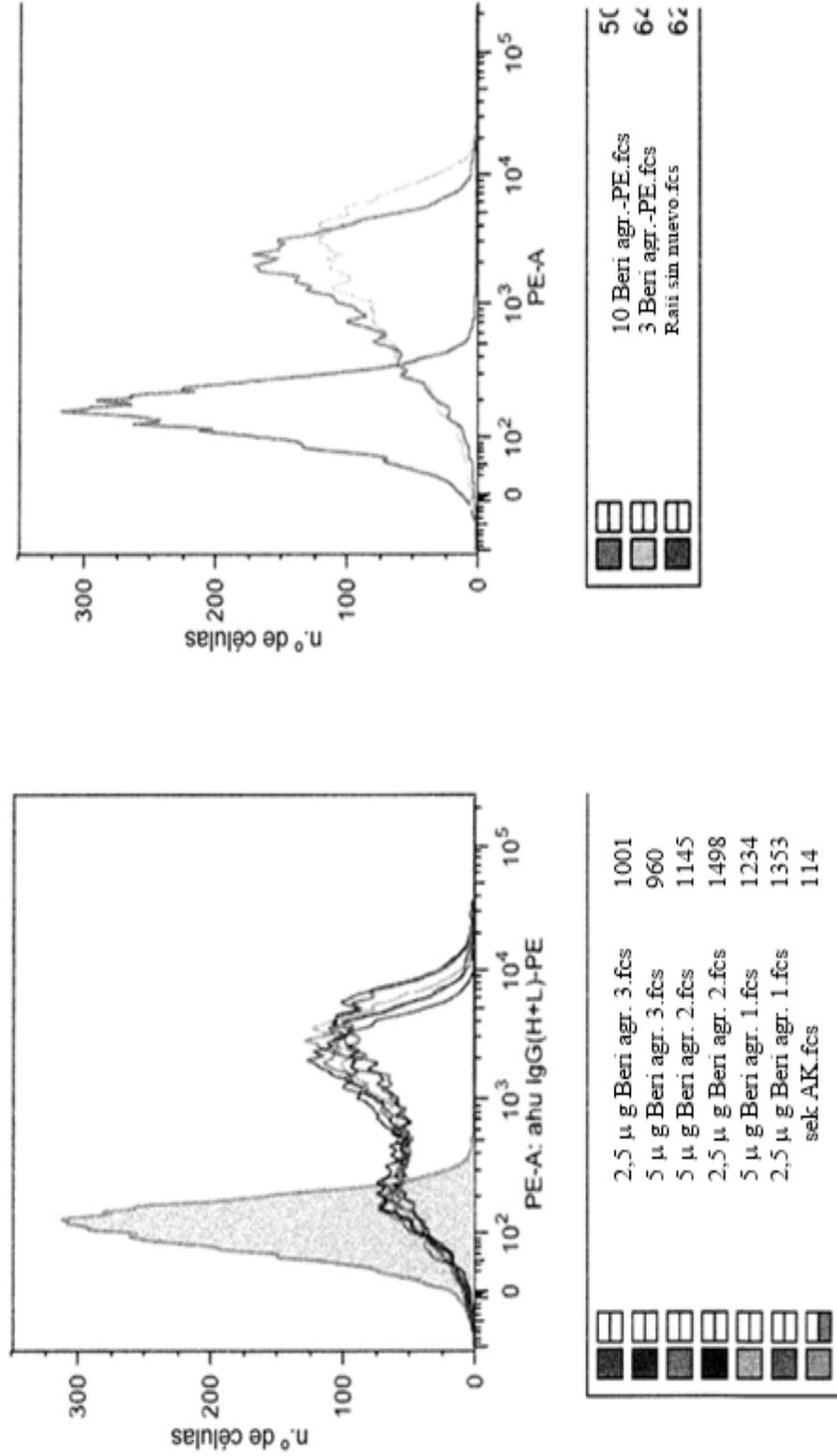
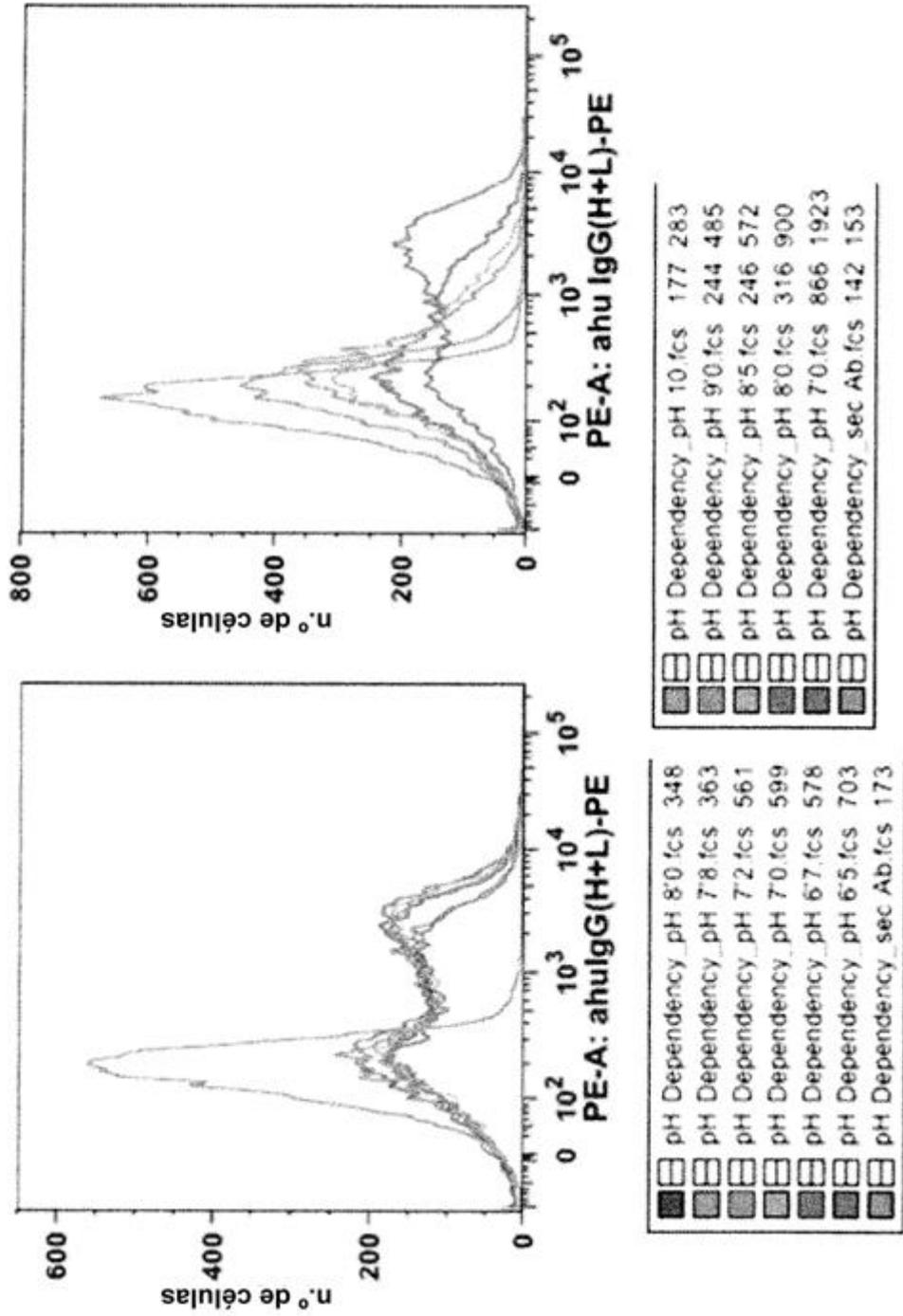


Figura 10

Figura 11a

Dependencia del pH de la unión de Beriglobin agregado a células Raji



Dependencia del pH de la unión de Beriglobin agregado a células Raji

pH	Mediana de IMF
6.5	703
6.7	578
7	599
7.2	561
7.8	363
8	348
8.5	246
9	244
10	177

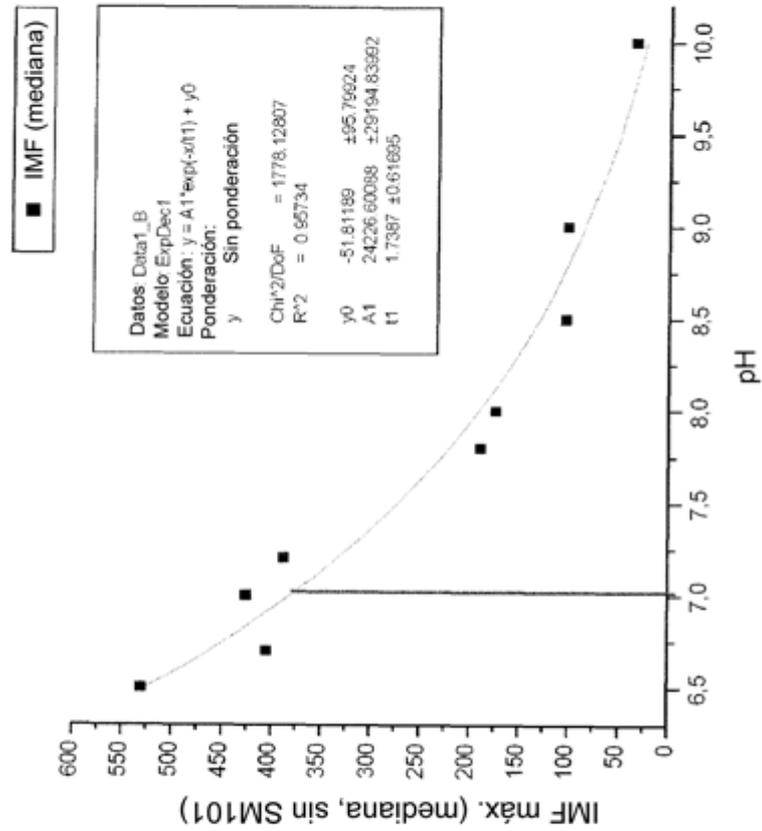


Figura 12

