

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 047**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2014 PCT/US2014/021574**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14149935**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014 E 14768761 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2970980**

54 Título: **Procedimientos de fabricación para controlar la lisina C-terminal, la galactosa y el contenido de ácido siálico en proteínas recombinantes**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361791094 P

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

19.11.2018

73 Titular/es:

JANSSEN BIOTECH, INC. (50.0%)

800/850 Ridgeview Drive

Horsham, PA 19044, US y

JANSSEN BIOLOGICS B.V. (50.0%)

72 Inventor/es:

FLIKWEERT, MARCEL;

GOOCHEE, CHARLES;

MASLANKA, FRANCIS;

NAGEL, FRANCISUS JOHANNES IGNATIUS;

RYLAND, JAMES y

SCHAFFER, EUGENE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 690 047 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

Procedimientos de fabricación para controlar la lisina C-terminal, la galactosa y el contenido de ácido siálico en proteínas recombinantes

5

Antecedentes de la invención

La lisina C-terminal (CTL) se elimina rápidamente de los anticuerpos inyectados, incluido infliximab, mediante carboxipeptidasas circulantes endógenas en el torrente sanguíneo (Cai, B. et al., "C-terminal Lysine Processing of Human Immunoglobulin G2 Heavy Chain in Vivo," Biotechnol. Bioeng. 2011; 108: 404-412) y, por lo tanto, se cree que tiene poco o ningún impacto sobre la seguridad y eficacia del producto. Sin embargo, el contenido de CTL en proteínas recombinantes que tienen restos de CTL se puede usar como una medida de la consistencia de la fabricación y la homogeneidad del producto.

10

El documento WO 2013/009648 describe un procedimiento de cultivo celular. Luo et al. (2012) Biotechnology and Bioengineering 109(9):2306–2315 describe el uso de sondas en la variación de lisina C-terminal en una producción de anticuerpo monoclonal recombinante. El documento WO 2014/143184 describe composiciones de especies de variantes de lisina moduladas y procedimientos para producir las mismas.

15

En contraste con el contenido de CTL, el contenido de ácido siálico en las proteínas recombinantes se ha asociado con muchos fenómenos de importancia fisiológica en seres humanos. Por ejemplo, la presencia de ácido siálico en las glicoproteínas, tal como eritropoyetina, promueve una semivida circulatoria prolongada, mientras que la ausencia de ácido siálico en la eritropoyetina conduce a una eliminación rápida de la proteína de la circulación. Además, el aumento del contenido de ácido siálico en proteínas puede modular la inmunogenicidad de la proteína en seres humanos. Debido a la importancia del ácido siálico en la seguridad y eficacia del producto, el contenido de ácido siálico debe mantenerse dentro de un intervalo que refleje el intervalo utilizado en la clínica.

20

25

Por lo tanto, existe la necesidad de comprender y controlar los factores relacionados con el procedimiento que afectan al contenido de CTL y e ácido siálico en las proteínas recombinantes, particularmente las proteínas recombinantes como REMICADE® (infliximab) o HUMIRA® (adalimumab), que se administran a seres humanos.

30

Sumario de la invención

La invención proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene un contenido de lisina C-terminal de 20 % a 70 %, y un contenido de ácido siálico de 1 % a 20 %, comprendiendo el procedimiento:

35

cultivar una célula huésped sensible al cinc transfectada con ADN que codifica el anticuerpo en un medio de cultivo que comprende cinc de 0,5 μ M a 6,5 μ M; y

40

controlar la concentración de cinc en el medio de cultivo, produciendo de ese modo el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

La invención proporciona además un procedimiento para controlar:

45

a) el contenido de lisina C-terminal de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene un contenido de lisina C-terminal de 20 % a 70 %;

b) el contenido de ácido siálico de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene un contenido de ácido siálico de 1 % a 20 %;

50

c) el contenido de galactosa de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene un contenido de galactosa de 50 % a 90 %; y/o

d) la relación entre ácido siálico y galactosa en un anticuerpo que tiene una relación entre ácido siálico galactosa de 0,05 a 0,20,

en un procedimiento para biosintetizar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en un medio de cultivo, comprendiendo el procedimiento:

55

controlar un nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo; y

60

regular el nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En el presente documento se desvelan procedimientos para producir un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), tal como el anticuerpo monoclonal cA2 (también denominado en el presente documento infliximab), que tiene un contenido deseado de lisina C-terminal (CTL), contenido de ácido siálico, contenido de galactosa y/o relación entre ácido siálico y galactosa mediante el control de las condiciones de cultivo,

65

incluida la concentración de cinc, la concentración de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el tiempo de cosecha.

5 Una realización de la invención es un procedimiento para producir un anticuerpo que tiene un contenido de lisina C-terminal de 20 % a 70 %, y un contenido de ácido siálico de 1 % a 20 %, comprendiendo el procedimiento cultivar una célula huésped sensible al cinc transfectada con ADN que codifica el anticuerpo en un medio de cultivo que comprende cinc a 0,5 μM a 6,5 μM ; y controlar la concentración de cinc en el medio de cultivo, produciendo de ese modo el anticuerpo. En algunas realizaciones, el contenido de lisina C-terminal del anticuerpo es de aproximadamente 40 % a aproximadamente 70 %, por ejemplo, de aproximadamente 55 % a aproximadamente 65 %
10 %, por ejemplo, o de aproximadamente 60 %. En algunas realizaciones, el contenido de ácido siálico del anticuerpo es de aproximadamente 3 % a aproximadamente 14 %. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene un contenido de galactosa de aproximadamente 50 % a aproximadamente 90 % o de aproximadamente 45 % a aproximadamente 85 %. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una relación entre ácido siálico y galactosa de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,20.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-TNF α o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe competitivamente la unión de A2 (número de referencia en ATCC PTA-7045) al TNF α humano; y (ii) se une a un epítipo neutralizante de TNF α humano con una afinidad de al menos 1×10^8 litro/mol, medida como una constante de asociación (K_a). El anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser de inmunoglobulina de clase IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM y, en algunas realizaciones, comprende una región constante de IgG1. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', F (ab')₂ y Fv.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región constante humana y una región variable no humana, o una región constante humana y una región variable humana.

30 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos una cadena ligera humana y al menos una cadena pesada humana. En algunas realizaciones, la cadena ligera comprende todas las regiones de unión a antígeno de la cadena ligera de A2 (número de referencia en ATCC PTA-7045). En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende todas las regiones de unión a antígeno de la cadena pesada de A2 (número de referencia en ATCC PTA-7045). En aún otras realizaciones, la cadena ligera comprende todas las regiones de unión a antígeno de la cadena ligera de A2 (número de referencia en ATCC PTA-7045) y la cadena pesada comprende todas las regiones de unión a antígeno de la cadena pesada de A2 (número de referencia en ATCC PTA-7045).

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región constante humana de IgG1 y una región variable no humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 5, o codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4.

45 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene especificidad epitópica idéntica al anticuerpo monoclonal cA2 y, en algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo es anticuerpo monoclonal cA2.

50 En algunas realizaciones, la concentración de cinc en el medio de cultivo está en el intervalo de aproximadamente 0,6 μM a aproximadamente 6,5 μM , o de aproximadamente 0,6 μM a aproximadamente 1,1 μM .

En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además EDTA en un intervalo de concentración de aproximadamente 2,5 μM a aproximadamente 30 μM , o aproximadamente 5 μM a aproximadamente 16 μM , y el procedimiento comprende además controlar la concentración de EDTA en el medio de cultivo.

55 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además recuperar el anticuerpo, por ejemplo, cuando las células huésped sensibles al cinc en el medio de cultivo alcanzan una densidad celular de aproximadamente 1,5 millones de células por ml a aproximadamente 11 millones de células por ml, o de aproximadamente 3 millones de células por ml a aproximadamente 11 millones de células por ml. En algunas realizaciones, la concentración de cinc se controla hasta que se recupera el anticuerpo o durante una fase de crecimiento exponencial de las células huésped sensibles al cinc.
60

En algunas realizaciones de la invención, controlar la concentración de cinc comprende controlar la concentración de cinc en el medio de cultivo y regular la concentración de cinc en el medio de cultivo, de manera que la concentración de cinc en el medio de cultivo sea de al menos 0,5 μM o esté en el intervalo de aproximadamente 0,6 μM a aproximadamente 6,5 μM .
65

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped sensible al cinc es una célula SP2/0.

Otra realización de la invención es un procedimiento para controlar el contenido de lisina C-terminal de un anticuerpo que tiene un contenido de lisina C-terminal de 20 % a 70 %, en un procedimiento para biosintetizar el anticuerpo en un medio de cultivo, comprendiendo el procedimiento controlar un nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo; y regular el nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo.

Todavía otra realización de la invención es un procedimiento para controlar el contenido de ácido siálico de un anticuerpo que tiene un contenido de ácido siálico de 1 % a 20 % en un procedimiento para biosintetizar el anticuerpo en un medio de cultivo, comprendiendo el procedimiento controlar un nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo; y regular el nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo.

Todavía otra realización de la invención es un procedimiento para controlar el contenido de galactosa de un anticuerpo que tiene un contenido de galactosa de 50 % a 90 % en un procedimiento para biosintetizar el anticuerpo en un medio de cultivo, comprendiendo el procedimiento controlar un nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo; y regular el nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo.

Todavía otra realización de la invención es un procedimiento para controlar la relación entre ácido siálico y galactosa en un anticuerpo que tiene una relación entre ácido siálico y galactosa de 0,05 % a 0,20 % en un procedimiento para biosintetizar el anticuerpo en un medio de cultivo, comprendiendo el procedimiento controlar un nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo; y regular el nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo.

En algunas realizaciones de un procedimiento para controlar el contenido de CTL, ácido siálico o galactosa, o la relación entre ácido siálico y galactosa, el anticuerpo es un anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o el anticuerpo se biosintetiza mediante una célula SP2/0.

En una realización, el anticuerpo es un mAAb que se une a aminoácidos de un epítipo de TNF, que se produce mediante un hibridoma o mediante un huésped recombinante. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que reconoce un epítipo reconocido por A2. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico designado A2 quimérico (cA2) (es decir, infliximab).

La caracterización y los procedimientos de fabricación y uso de anticuerpos anti-TNF se desvelan y describen con detalle en, por ejemplo, "Anti-TNF antibodies, compositions, methods and uses", George Heavner et al., la patente de Estados Unidos N.º 7.250.165, presentada el 1 de agosto de 2001, expedida el 31 de julio de 2007 y "Anti-TNF antibodies, compositions, methods and uses", Jill Giles-Komar et al., número de solicitud de Estados Unidos 10/394.471, número de publicación US 2004/0185047 A1, presentada el 21 de marzo de 2003, y "Recombinant A2-specific TNF α -specific antibodies", Junming Le et al., patente de Estados Unidos n.º 7.252.823, presentada el 6 de febrero de 2004, expedida el 7 de agosto de 2007.

En algunas realizaciones, los anticuerpos incluyen el mAAb A2 murino, que se produce en una línea celular denominada c134A y anticuerpo quimérico cA2, que se produce en una línea celular denominada c168A. La línea celular c134A se almacena en Janssen Research & Development, Welsh & McKean Road, Springhouse, PA. La línea celular c168A se almacena en Janssen Research & Development, 200 Great Valley Parkway, Malvern, Pensilvania, 19355, Janssen Biologics BV, Leiden, Países Bajos.

Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usarse para mejorar la homogeneidad del lote en, por ejemplo, un procedimiento de fabricación comercial, tal como el procedimiento de fabricación utilizado para producir infliximab, un anticuerpo monoclonal anti-TNF α usado en el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades autoinmunes en seres humanos.

Breve descripción de las figuras

Lo anterior será evidente a partir de la siguiente descripción más particular de realizaciones de ejemplo de la invención, como se ilustra en las figuras adjuntas.

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado a color. La Oficina entregará copias de la presente patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color tras petición y abono de la tarifa necesaria.

La figura 1 muestra un isoelectroenfoco capilar (cIEF) de una muestra de infliximab.

La figura 2 es un gráfico de línea ajustada del porcentaje de des-lisina (% sin lisina C-terminal, abreviado como des-Lys) del mapeo de péptidos de fase inversa en función del porcentaje del pico 1 de cIEF y muestra la correlación entre el contenido de CTL (expresado como porcentaje de des-Lys) y el porcentaje del pico 1.

La figura 3 es un gráfico de la eliminación de CTL (expresado como el porcentaje de des-Lys y calculado utilizando el procedimiento de cIEF de los datos del pico 1) como una función de la edad del biorreactor y

muestra el efecto de concentraciones variables de Zn^{+2} sobre la eliminación de CTL. Eje Y: % de desl-Lys; Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 4 es un gráfico del porcentaje de oligosacáridos de infliximab con ácido siálico, según lo determinado por el procedimiento WAX, como una función de la edad del biorreactor, y muestra el efecto de concentraciones variables de Zn^{+2} sobre el porcentaje de ácido siálico. Eje Y: % de ácido siálico; Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 5 es un gráfico de la densidad de células viables como una función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de concentraciones variables de Zn^{+2} sobre la densidad de células viables. Eje Y: densidad de células viables (millones de células viables/ml); Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 6 es un gráfico del porcentaje de células viables en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de concentraciones variables de Zn^{+2} sobre la viabilidad del cultivo. Eje Y: % de células viables; Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 7 es un gráfico de la concentración de infliximab en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de concentraciones variables de Zn^{+2} sobre la concentración de infliximab. La concentración del eje y en mg/ml como se indica contiene un error tipográfico. La concentración es mg/l. Eje Y: concentración de infliximab (mg/l), eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 8A es un gráfico de la eliminación de CTL (expresado como el porcentaje de des-Lys y calculado usando el procedimiento cIEF de datos del Pico 1) como una función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de concentraciones variables de EDTA sobre la eliminación de CTL en presencia de Zn^{+2} 0,76 μ M (la concentración inicial de Zn^{+2} en el biorreactor correspondiente a la etiqueta "Fe:5 Zn:1 EDTA: 10" fue 6,3 μ M, en lugar de 0,76 μ M; la concentración objetivo de Zn^{+2} 0,76 μ M se implementó desde el día 13 hasta el final del experimento). Eje Y: % de desl-Lys; Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 8B es un gráfico de la eliminación de CTL (expresado como el porcentaje de des-Lys y calculado usando el procedimiento cIEF de datos del Pico 1) como una función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de concentraciones variables de EDTA sobre la eliminación de CTL en presencia de Zn^{+2} 1,7 μ M. Eje Y: % de desl-Lys; Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 9A es un gráfico del porcentaje de oligosacáridos de infliximab con ácido siálico, según se determina mediante el procedimiento WAX, en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de concentraciones variables de EDTA sobre el porcentaje de ácido siálico en presencia de Zn^{+2} 0,76 μ M (la concentración inicial de Zn^{+2} en el biorreactor correspondiente a la etiqueta "Fe:5 Zn:1 EDTA: 10" fue 6,3 μ M, en lugar de 0,76 μ M; la concentración objetivo de Zn^{+2} 0,76 μ M se implementó desde el día 13 hasta el final del experimento). Eje Y: % de ácido siálico; Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 9B es un gráfico del porcentaje de oligosacáridos de infliximab con ácido siálico, según se determina mediante el procedimiento WAX, en función de la edad del biorreactor, y muestra el efecto de las concentraciones variables de EDTA sobre el contenido de ácido siálico en presencia de Zn^{+2} 1,7 μ M. Eje Y: % de ácido siálico; Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 9C es un gráfico del porcentaje de G0F (componente WAX 1) como una función de la edad del biorreactor, y muestra el efecto de concentraciones variables de EDTA sobre el porcentaje de especies no galactosiladas en presencia de Zn^{+2} 0,76 μ M (la concentración inicial de Zn^{+2} en el biorreactor correspondiente a la etiqueta "Fe:5 Zn:1 EDTA: 10" fue 6,3 μ M, en lugar de 0,76 μ M; la concentración objetivo de Zn^{+2} 0,76 μ M se implementó desde el día 13 hasta el final del experimento).

La figura 9D es un gráfico de G0F (componente de WAX 1) como una función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de concentraciones variables de EDTA sobre el porcentaje de especies no galactosiladas en presencia de Zn^{+2} 1,7 μ M.

La figura 10 es un gráfico de la densidad de células viables en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de concentraciones variables de EDTA sobre la densidad de células viables en presencia de Zn^{+2} 0,76 μ M o Zn^{+2} 1,7 μ M (la concentración inicial de Zn^{+2} en el biorreactor correspondiente a la etiqueta "Fe:5 Zn:1 EDTA: 10" fue 6,3 μ M, en lugar de 0,76 μ M; la concentración objetivo de Zn^{+2} 0,76 μ M se implementó desde el día 13 hasta el final del experimento). Eje Y: densidad de células viables (millones de células viables/ml); Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 11A es un gráfico del porcentaje de células viables en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de concentraciones variables de EDTA sobre la viabilidad del cultivo en presencia de Zn^{+2} 0,76 μ M o Zn^{+2} 1,7 μ M (la concentración inicial de Zn^{+2} en el biorreactor correspondiente a la etiqueta "Fe:5 Zn:1 EDTA:10" fue 6,3 μ M en lugar de 0,76 μ M; la concentración objetivo de Zn^{+2} 0,76 μ M se implementó desde el día 13 hasta el final del experimento). Eje Y: % de células viables; Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 11B es una ampliación de los días 0-25 del gráfico mostrado en la figura 11A. Eje Y: densidad de células viables (millones de células viables/ml); Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 12A es un gráfico de la concentración de infliximab en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de las concentraciones variables de EDTA sobre la concentración de infliximab en presencia de Zn^{+2} 0,76 μ M o Zn^{+2} 1,7 μ M (la concentración inicial de Zn^{+2} en el biorreactor correspondiente a la etiqueta "Fe:5 Zn:1 EDTA: 10" fue 6,3 μ M, en lugar de 0,76 μ M; la concentración objetivo de Zn^{+2} 0,76 μ M se implementó desde el día 13 hasta el final del experimento). La concentración del eje y en mg/ml como se indica contiene un error tipográfico. La concentración es mg/l. Eje Y: concentración de infliximab (mg/l), eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 12B es una ampliación de los días 0-25 del gráfico mostrado en la figura 12A. La concentración del eje y en mg/ml como se indica contiene un error tipográfico. La concentración es mg/l. Eje Y: concentración de infliximab (mg/l), eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 13A es un gráfico de la eliminación de CTL (expresado como porcentaje de des-Lys y calculado usando el procedimiento cIEF de datos del Pico 1) como una función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de la concentración variable de EDTA (μM) sobre la eliminación de CTL (los resultados son presentado como un promedio de dos biorreactores duplicados). Eje Y: % de des-Lys; Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 13B es un gráfico del porcentaje de oligosacáridos de infliximab con ácido siálico, según se determina mediante el procedimiento WAX, en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de la concentración variable de EDTA (μM) sobre el contenido de ácido siálico (los resultados se presentan como promedio de dos biorreactores duplicados). Eje Y: % de ácido siálico; Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 13C es un gráfico de la densidad de células viables en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de la concentración variable de EDTA (μM) sobre la densidad de células viables. Eje Y: densidad de células viables (millones de células viables/ml); Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 13D es un gráfico del porcentaje de células viables en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de la concentración variable de EDTA (μM) sobre la viabilidad del cultivo. Eje Y: % de células viables: Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 13E es un gráfico de la concentración de infliximab en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de la concentración variable de EDTA (μM) sobre la concentración de infliximab. La concentración del eje y en mg/ml como se indica contiene un error tipográfico. La concentración es mg/l. Eje Y: concentración de infliximab (mg/l), eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 13B es una ampliación de los días 0-25 del gráfico mostrado en la figura 13E. La concentración del eje y en mg/ml como se indica contiene un error tipográfico. La concentración es mg/l. Eje Y: concentración de infliximab (mg/l), eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 13G es un gráfico del porcentaje de G0F (componente WAX 1) como una función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de la concentración variable de EDTA (μM) sobre el porcentaje de oligosacáridos de infliximab que carecen de galactosa. Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 14A es un gráfico de eliminación de CTL (expresado como porcentaje de des-Lys y calculado usando el procedimiento cIEF de datos del Pico 1) como una función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de la concentración variable de EDTA (μM) sobre la eliminación de CTL. Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 14B es un gráfico del porcentaje de oligosacáridos de infliximab con ácido siálico, según se determina mediante el procedimiento WAX, en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de la concentración variable de EDTA (μM) sobre el contenido de ácido siálico.

La figura 14C es un gráfico de la densidad de células viables en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de la concentración variable de EDTA (μM) sobre la densidad de células viables. Eje Y: densidad de células viables (millones de células viables/ml); Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 14D es un gráfico del porcentaje de células viables en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de la concentración variable de EDTA (μM) sobre la viabilidad del cultivo. Eje Y: % de células viables: Eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 14E es un gráfico de la concentración de infliximab en función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de la concentración variable de EDTA (μM) sobre la concentración de infliximab. La concentración del eje y en mg/ml como se indica contiene un error tipográfico. La concentración es mg/l. Eje Y: concentración de infliximab (mg/l), eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 14F es una ampliación de los días 0-25 del gráfico mostrado en la figura 14E. La concentración del eje y en mg/ml como se indica contiene un error tipográfico. La concentración es mg/l. Eje Y: concentración de infliximab (mg/l), eje X: edad del biorreactor en días.

La figura 15 es un gráfico del porcentaje de G0F (componente WAX 1) como una función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de la concentración variable de EDTA (μM) sobre el porcentaje de oligosacáridos de infliximab que carecen de galactosa.

La figura 16 muestra una ruta biosintética para los oligosacáridos neutros más comunes de infliximab, G0F, G1F y G2F, y una ruta biosintética desde oligosacáridos neutros a formas sialiladas.

La figura 17 es un gráfico de la eliminación de CTL (calculada usando el procedimiento cIEF de los datos del Pico 1) como una función de la concentración de Zn^{+2} y muestra el porcentaje de eliminación de CTL el día 20 para los experimentos DOE3 y BSA de n.º de mezcla 1 (los puntos azules de datos y la línea representa el promedio).

La figura 18 es un gráfico de la eliminación de CTL (calculada usando el procedimiento cIEF de los datos del Pico 1) como una función de la concentración de Zn^{+2} y muestra el porcentaje de eliminación de CTL el día 13 para el experimento DOE3.

La figura 19 es un gráfico del contenido de ácido siálico como una función de la concentración de Zn^{+2} y muestra el porcentaje de ácido siálico el Día 20 para los experimentos DOE3 y BSA n.º de mezcla. 1 (la línea representa el promedio).

La figura 20 es un gráfico del porcentaje del componente WAX 1 (GOF) como función de la concentración de Zn^{+2} y muestra el porcentaje de oligosacáridos de infliximab que carecen de galactosa el día 20 para los experimentos DOE3 y BSA n.º de mezcla 1.

La figura 21 es un gráfico de la relación estimada entre ácido siálico y galactosa (estimada como el porcentaje de ácido siálico/(100 - porcentaje del componente 1 de WAX) como una función de la concentración de Zn^{+2} y

muestra la relación estimada entre ácido siálico y galactosa el día 20 para los experimentos DOE3 y BSA n.º de mezcla 1.

La figura 22 es un gráfico de la eliminación de CTL (calculada usando el procedimiento cIEF de los datos del Pico 1) como una función de la concentración de EDTA y muestra el porcentaje de eliminación de CTL en presencia de Zn^{+2} 1,1-1,2 μM los días 33-35 para los experimentos de n.º de mezcla 1 y n.º 2.

La figura 23 es un gráfico del porcentaje de ácido siálico en función de la concentración de EDTA y muestra el porcentaje de ácido siálico en presencia de Zn^{+2} 1,1-1,2 μM los Días 33-35 para los experimentos de mezcla n.º 1 y n.º 2.

La figura 24 es un gráfico del porcentaje del componente WAX 1 en función de la concentración de EDTA y muestra el porcentaje de oligosacáridos de infliximab que carecen de galactosa en presencia de Zn^{+2} 1,1-1,2 μM los días 33-35 para los experimentos de mezcla n.º 1 y n.º 2.

La figura 25 es un gráfico de la relación estimada entre ácido siálico y galactosa (estimada como el porcentaje de ácido siálico/(100 - porcentaje del componente WAX 1) en función de la concentración de EDTA y muestra la relación estimada entre ácido siálico y galactosa en presencia de Zn^{+2} 1,1 -1,2 μM los días 33-35 para los experimentos de mezcla n.º 1 y n.º 2.

La figura 26 es un gráfico del porcentaje de ácido siálico (calculado a partir del componente 5 de WAX) como una función del porcentaje de G0F (calculado a partir del componente 1 de WAX) y muestra la relación inversa entre el porcentaje de ácido siálico y el componente 1 de WAX, un indicador de los oligosacáridos de infliximab que carecen de galactosa, para los experimentos DOE3 y BSA de mezcla n.º 1 y n.º 2.

Las figuras 27A y 27B proporcionan diagramas esquemáticos de los plásmidos usados para la expresión de las cadenas H (pA2HG1apgpt) y L (pA2HuKapgpt) del anticuerpo A2 quimérico.

La figura 8 es una secuencia de aminoácidos del TNF humano como la SEQ ID NO: 1.

Las figuras 29A-29B. La figura 29A es una secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO:2) y la correspondiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:3) de una región variable de la cadena ligera de cA2 clonada. La figura 29B es una secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 4) y la correspondiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:5) de una región variable de la cadena pesada de cA2 clonada.

Descripción detallada de la invención

A continuación, sigue una descripción de ejemplos de realización de la invención.

Una realización es un procedimiento para producir un anticuerpo que tiene un contenido de lisina C-terminal de 20 % a 70 %, y un contenido de ácido siálico de 1 % a 20 %, que comprende cultivar una célula huésped sensible al cinc transfectada con ADN que codifica el anticuerpo en un medio de cultivo que comprende 0,5 μM a 6 μM de zinc; y controlar la concentración de cinc en el medio de cultivo, produciendo de ese modo el anticuerpo.

La eliminación de CTL se expresa en el presente documento como el porcentaje de cadenas pesadas que poseen una lisina C-terminal y se puede calcular usando la ecuación siguiente: contenido de CTL (%) = (número de cadenas pesadas que poseen una CTL)/(número total de cadenas pesadas) x 100. La eliminación de CTL se expresa en el presente documento como el porcentaje de cadenas pesadas que carecen de lisina en C-terminal (des-Lys). Por tanto, "80 % de Des-Lys" es equivalente a 20 % de contenido de CTL. En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, el contenido de CTL del anticuerpo o anticuerpo anti TNF α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, es de aproximadamente 40 % a aproximadamente 70 %, específicamente de aproximadamente 55 % a aproximadamente 65 %, y, más específicamente, aproximadamente 60 %.

El contenido de ácido siálico se expresa en el presente documento como el porcentaje de oligosacáridos que contienen ácido siálico y puede calcularse usando la siguiente ecuación: contenido de ácido siálico (%) = (número de oligosacáridos que contienen un ácido siálico)/(número total de oligosacáridos) x 100. Esta ecuación se aplica independientemente del número de restos de ácido siálico en el oligosacárido. En otras palabras, independientemente de si hay, por ejemplo, uno o dos restos de ácido siálico en el oligosacárido, el oligosacárido solo se cuenta una vez con el fin de calcular el contenido de ácido siálico. En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, el contenido de ácido siálico del anticuerpo o anticuerpo anti-TNF α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, es de aproximadamente 3 % a aproximadamente 14 %.

El contenido de galactosa se expresa en el presente documento como el porcentaje de oligosacáridos que contienen galactosa y puede calcularse usando la siguiente ecuación: contenido de galactosa (%) = (número de oligosacáridos que contienen galactosa)/(número total de oligosacáridos) x 100. Esta ecuación se aplica independientemente del número de unidades de galactosa en el oligosacárido. En otras palabras, independientemente de si hay, por ejemplo, uno o dos restos de galactosa en el oligosacárido, el oligosacárido solo se cuenta una vez con el fin de calcular el contenido de galactosa. En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, un anticuerpo o anticuerpo anti-TNF α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene un contenido de galactosa de aproximadamente 50 % a aproximadamente 90 % y, específicamente, de aproximadamente 45 % a aproximadamente 85 %.

Típicamente, ambas cadenas pesadas de un anticuerpo, tal como infliximab, están glicosiladas. Sin embargo, en algunas circunstancias, algunas de las cadenas pesadas permanecen aglicosiladas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, aproximadamente el 94 % de las moléculas de anticuerpo están glicosiladas en ambas cadenas, aproximadamente el 6 % de las moléculas de anticuerpo están hemiglicosiladas, y aproximadamente el 0,1 % de las moléculas de anticuerpo están completamente aglicosiladas.

La relación entre ácido siálico y galactosa se calcula a partir de la relación molar entre ácido siálico y galactosa en los oligosacáridos de infliximab. En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, el anticuerpo o anticuerpo anti-TNF α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene una relación entre ácido siálico y galactosa de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,20.

"Célula huésped sensible al cinc", como se usa en el presente documento, significa una célula huésped que responde a las fluctuaciones en la concentración de cinc en su medio de cultivo. La capacidad de respuesta de una célula huésped a las fluctuaciones en la concentración de cinc puede evaluarse, por ejemplo, midiendo el efecto de las concentraciones variables de cinc sobre el contenido de CTL, el contenido de ácido siálico, el contenido de galactosa y la relación entre ácido siálico y galactosa en un anticuerpo producido por la célula huésped. Los procedimientos para evaluar el contenido de CTL, el contenido de ácido siálico, el contenido de galactosa y la relación entre ácido siálico y galactosa en un anticuerpo producido por una célula huésped se describen en los Ejemplos.

En el presente documento se desvela un medio de cultivo que comprende una cantidad de cinc mayor que aproximadamente 0,5 μM . En algunas realizaciones, la concentración de cinc en el medio de cultivo está en el intervalo de aproximadamente 0,6 μM a aproximadamente 6,5 μM y, preferentemente, en el intervalo de aproximadamente 0,6 μM a aproximadamente 1,1 μM . En algunas realizaciones, la cantidad o concentración de cinc en el medio de cultivo no es tóxica para las células huésped sensibles al cinc, por ejemplo, no reduce ni reduce sustancialmente la viabilidad celular, el crecimiento celular o la producción de anticuerpos, particularmente en los primeros 20- 25 días del cultivo.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ("EDTA" o "EDTA total" como se hace referencia en el presente documento) en un intervalo de concentración de aproximadamente 2,5 μM a aproximadamente 30 μM y, preferentemente, en un intervalo de concentración de aproximadamente 5 μM a aproximadamente 16 μM . "EDTA libre de hierro" como se usa en el presente documento, se refiere a EDTA que no está quelado a hierro (Fe^{+3}). La cantidad o concentración de EDTA libre de hierro (abreviado [EDTA - Fe^{+3}]) puede calcularse restando la cantidad o concentración de Fe^{3+} de la cantidad o concentración de EDTA total. El ion Fe^{+3} tiene la afinidad más alta por EDTA de los iones metálicos en el medio de cultivo. Por lo tanto, el Fe^{+3} , cuando está presente, se unirá, preferentemente, a EDTA en el medio de cultivo celular. La concentración de EDTA libre de hierro representa el EDTA disponible para unirse a Zn^{+2} y otros iones metálicos en el medio de cultivo.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad o concentración de EDTA y/o EDTA libre de hierro en el medio de cultivo no es tóxica para las células huésped sensibles al cinc, por ejemplo, no reduce ni reduce sustancialmente la viabilidad celular, el crecimiento celular o la producción de anticuerpos, particularmente en los primeros 20-25 días del cultivo.

"Controlar", como se usa en el presente documento, significa verificar y/o regular. El control incluye la detección/medición de una sustancia que se está controlando (directa o indirectamente) y el uso de esas mediciones para proporcionar retroalimentación para realizar correcciones hacia el resultado deseado. El control incluye tanto la monitorización como la regulación, por ejemplo, de la concentración de cinc y/o EDTA y/o EDTA libre de hierro en un medio de cultivo. Típicamente, la concentración de cinc y/o EDTA y/o EDTA libre de hierro se controla durante la duración del cultivo. En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, la concentración de cinc y/o EDTA y/o EDTA libre de hierro se controla durante una fase de crecimiento exponencial de las células huésped sensibles al cinc, o durante los primeros 10-25 días de cultivo.

La concentración de cinc y/o EDTA y/o EDTA libre de hierro en el medio de cultivo puede controlarse, por ejemplo, monitorizando un nivel de cinc y/o EDTA y/o EDTA libre de hierro en el medio de cultivo; y regular el nivel de cinc y/o EDTA y/o EDTA libre de hierro en el medio de cultivo. Por lo tanto, en algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, controlar la concentración de cinc comprende monitorizar la concentración de cinc en el medio de cultivo y regular la concentración de cinc en el medio de cultivo, de manera tal que la concentración de cinc en el medio de cultivo sea al menos 0,5 μM o de aproximadamente 0,6 μM a aproximadamente 6,5 μM .

Los expertos en la técnica conocen procedimientos para monitorizar el nivel de cinc y/o EDTA y/o EDTA libre de hierro. Por ejemplo, la concentración de cinc y otros iones metálicos se puede medir mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), mientras que la concentración de EDTA se puede medir mediante un procedimiento de HPLC.

"Regular", como se usa en el presente documento, significa poner o mantener en orden. La regulación incluye mantener, por ejemplo, la concentración de cinc y/o EDTA en un medio de cultivo y ajustar, por ejemplo, la concentración de cinc y/o EDTA en un medio de cultivo, según sea necesario. Por lo tanto, el cinc (por ejemplo, una cantidad no tóxica de cinc) puede incluirse en el medio de cultivo a una concentración inicial de, por ejemplo, mayor
5 que aproximadamente 5 μM , después ajustarse a una concentración de, por ejemplo, 0,6 μM a aproximadamente 1,1 μM . El ajuste se puede hacer, por ejemplo, al mismo tiempo o justo después de la transición de la fase de crecimiento exponencial a la fase de estado estable. Como alternativa, la concentración de cinc puede mantenerse a una concentración de, por ejemplo, 0,6 μM a aproximadamente 1,1 μM durante la duración del cultivo.

10 La regulación del nivel de cinc y/o EDTA y/o EDTA libre de hierro puede lograrse, por ejemplo, mediante la adición directa de zinc, hierro y/o EDTA al medio de cultivo; mediante la mezcla de materias primas que contienen cinc, hierro y/o EDTA; mediante el tratamiento de las materias primas para ajustar las concentraciones de cinc, hierro y/o EDTA de las mismas; y/o mediante la modificación del procedimiento de fabricación de las materias primas para
15 alcanzar los niveles deseados de cinc, hierro y/o EDTA. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para regular los componentes de un medio de cultivo.

El medio de cultivo puede comprender otros ingredientes además de cinc y/o EDTA. La elección de un medio de cultivo adecuado está dentro del conocimiento de un experto en la técnica. En algunas realizaciones, el medio de cultivo es un medio sin suero.

20 Se puede usar cualquier célula huésped conocida en la técnica para usar para producir anticuerpos, incluyendo células de mamífero, tales como células SP2/0, por ejemplo, células SP2/0 de ratón (Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581). Otras células huésped de ejemplo son líneas celulares murinas NS0 (Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Salisbury, Wiltshire, Reino Unido, N.º en ECACC
25 85110503), FO (ATCC CRL-1646) y Ag653 (ATCC CRL-1580). Una línea celular de mieloma humano de ejemplo es U266 (ATCC CRL-TIB-196). Otras líneas celulares útiles incluyen las derivadas de células de ovario de hámster chino (CHO), tales como CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD), CHO-K1 (ATCC CRL-61) o DG44. Las células se pueden cultivar en suspensión monocelular o de manera dependiente de anclaje.

30 Se conocen en la técnica diversos sistemas de cultivo, que incluyen frascos, botellas giratorias y biorreactores, por ejemplo, biorreactores de tanque agitado. El medio de cultivo puede agregarse en un procedimiento discontinuo, en el que el medio de cultivo se añade una vez a las células en un solo lote o, preferentemente, en un procedimiento discontinuo alimentado, en el que se añaden periódicamente pequeñas cantidades de medio de cultivo. Las células huésped también se pueden cultivar en un cultivo de perfusión, que implica la retirada continua de un volumen de
35 medio de cultivo del cultivo, y la sustitución del volumen retirado con un volumen comparable de medio nuevo. Típicamente, los cultivos perfundidos pueden manejarse para lograr densidades celulares más altas que los cultivos discontinuos y se pueden mantener durante períodos de tiempo más largos. Los cultivos perfundidos también permite cosechar de forma repetida.

40 Los procedimientos para producir un anticuerpo pueden comprender además recuperar el anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede recuperarse cuando las células huésped sensibles al cinc en el medio de cultivo alcanzan una densidad celular de aproximadamente 1,5 millones de células por ml a aproximadamente 11 millones de células por ml y, preferentemente, aproximadamente 3 millones de células por ml a aproximadamente 11 millones de células por ml. Un anticuerpo puede recuperarse, por ejemplo, mediante captura directa del producto (DPC). En
45 algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, la concentración de cinc se controla hasta que se recupera el anticuerpo.

El contenido de CTL y ácido siálico se puede controlar con todavía mayor precisión controlando la edad de la célula en el momento de la cosecha o recuperación del producto. Por lo tanto, en algunas realizaciones de los
50 procedimientos descritos en el presente documento, el anticuerpo se recupera al mismo tiempo o justo después de la transición de la fase de crecimiento exponencial a la fase estable. En otras realizaciones, el anticuerpo se recupera durante la fase estable del crecimiento del cultivo. En algunas realizaciones, el anticuerpo se recupera en los primeros 25 días de cultivo, por ejemplo, los días 10-25, los días 15-20, o alrededor del día 20. En otras realizaciones, el anticuerpo se recupera después de los primeros 25 días de cultivo.

55 En el presente documento también se proporciona un procedimiento para controlar el contenido de lisina C-terminal de un anticuerpo que tiene un contenido de lisina C-terminal de aproximadamente 20 % a aproximadamente 70 %, en un procedimiento para biosintetizar el anticuerpo en un medio de cultivo, comprendiendo el procedimiento monitorizar un nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo; y regular el nivel de cinc en
60 el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo.

En el presente documento también se proporciona un procedimiento para controlar el contenido de ácido siálico de un anticuerpo que tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 %, en un
65 procedimiento para biosintetizar el anticuerpo en un medio de cultivo, comprendiendo el procedimiento monitorizar un nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo; y regular el nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo.

En el presente documento también se proporciona un procedimiento para controlar el contenido de galactosa de un anticuerpo que tiene un contenido de galactosa de aproximadamente 50 % a aproximadamente 90 %, en un procedimiento para biosintetizar el anticuerpo en un medio de cultivo, comprendiendo el procedimiento monitorizar un nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo; y regular el nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo.

En el presente documento se proporciona un procedimiento para controlar la relación entre ácido siálico y galactosa de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,20 en un procedimiento para biosintetizar el anticuerpo en un medio de cultivo, comprendiendo el procedimiento monitorizar un nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo; y regular el nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo.

En algunas realizaciones de un procedimiento para controlar el contenido de CTL, ácido siálico o galactosa, o la relación entre ácido siálico y galactosa, el anticuerpo es un anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o el anticuerpo se biosintetiza en una célula SP2/0 o una célula CHO.

Anticuerpos y fragmentos de los mismos

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" incluye un anticuerpo completo y cualquier fragmento de unión a antígeno o una sola cadena del mismo.

Los anticuerpos pueden incluir al menos uno de una región constante de cadena pesada (H_c), una región variable de cadena pesada (H_v), una región variable de cadena ligera (L_v) y una región constante de cadena ligera (L_c), en el que un Ab policlonal, un Ab monoclonal, fragmento y/o de los mismos incluyen al menos una región variable de cadena pesada (H_v) o región variable de cadena ligera (L_v) que se une a una porción de un antígeno e inhibe y/o neutraliza al menos una actividad biológica del antígeno.

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender una región de unión a antígeno que comprende al menos una región determinante de la complementariedad humana (CDR1, CDR2 y CDR3) o variante de al menos una región variable de cadena pesada y al menos una región determinante de la complementariedad humana (CDR1, CDR2 y CDR3) o variante de al menos una región variable de cadena ligera. Tales anticuerpos se pueden preparar uniendo químicamente las diversas porciones (por ejemplo, CDR, marco) del anticuerpo utilizando técnicas convencionales, preparando y expresando una (es decir, una o más) molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo usando técnicas convencionales de tecnología de ADN recombinante o usando cualquier otro procedimiento adecuado.

Un anticuerpo puede ser de primate, mamífero, murino, quimérico, humanizado o humano. Un anticuerpo puede incluir, por ejemplo, al menos uno de anticuerpos quiméricos murino-humanos, anticuerpos murinos, anticuerpos humanos o cualquier porción de los mismos, que tiene al menos un fragmento de unión a antígeno o región de una región variable de inmunoglobulina.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas de las cuales derivan diferentes porciones de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, pueden retener al menos un dominio distinto, generalmente el dominio variable, de una especie y el resto de otra especie; por ejemplo, anticuerpos quiméricos de ratón-ser humano. Se usan principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para aumentar los rendimientos en la producción, por ejemplo, cuando los mAb murinos tienen mayores rendimientos de los de hibridomas pero mayor inmunogenicidad en seres humanos, de manera que se usan mAb quiméricos humanos/murinos. Los anticuerpos quiméricos y los procedimientos para su producción son conocidos en la técnica (Cabilly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273–3277 (1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851–6855 (1984); Neuberger et al., Nature 314:268–270 (1985); y Harlow and Lane Antibodies: a Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988)).

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo quimérico" incluye inmunoglobulinas monovalentes, divalentes o polivalentes. Un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero (HL) formado por una cadena H quimérica asociada a través de puentes disulfuro con una cadena L quimérica. Un anticuerpo quimérico divalente es un tetrámero (H_2L_2) formado por dos dímeros HL asociados a través de al menos un puente disulfuro. También se puede producir un anticuerpo quimérico polivalente, por ejemplo, empleando una región C_H que se agrega (por ejemplo, de una cadena H de IgM o cadena μ).

Los anticuerpos "humanizados" (también conocidos como anticuerpos injertados con CDR) se producen mediante un procedimiento para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales (mAb) a partir de fuentes xenogénicas (habitualmente roedores) y para mejorar las funciones efectoras (por ejemplo, ADCC, activación del complemento y/o unión de C1q). Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos de una fuente que no es humana, por ejemplo, pero sin limitaciones, de ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. El mAb modificado por ingeniería genética se puede diseñar usando técnicas de biología molecular. El simple injerto de

CDR de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de roedores en marcos humanos a menudo da como resultado la pérdida de afinidad y/o especificidad de unión del mAb original. Para humanizar un anticuerpo, el diseño del anticuerpo humanizado puede incluir variaciones tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos en restos de las CDR y la sustitución posterior de restos del mAb de roedor en las regiones marco humanas (retromutaciones). Los procedimientos para diseñar o humanizar anticuerpos no humanos o humanos son bien conocidos en la técnica.

La expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana o estrechamente relacionadas con las mismas. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Por tanto, como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína (por ejemplo, CDR, marco, dominios CL, CH (por ejemplo, CH1, CH2, CH3), bisagra, (VL, VH)) es sustancialmente similar a un anticuerpo de la línea germinal humana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" también se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína (por ejemplo, CDR, marco, dominios CL, CH (por ejemplo, CH1, CH2, CH3), bisagra, (VL, VH)) es sustancialmente no inmunogénico en seres humanos, con cambios o variaciones de secuencia únicamente menores. De forma similar, los anticuerpos designaron primate (mono, babuino, chimpancé, etc.), roedor (ratón, rata, conejo, cobaya, hámster y similares) y otros mamíferos designan dichos anticuerpos específicos de especie, subgénero, género, subfamilia y familia. Un anticuerpo humano puede producirse en una célula procarionota o eucariota animal no humana que es capaz de expresar genes de inmunoglobulina humana reordenados funcionalmente (por ejemplo, cadena pesada y/o cadena ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo monocatenario, puede comprender un péptido enlazador que no se encuentra en los anticuerpos humanos nativos. Por ejemplo, un Fv puede comprender un péptido enlazador, tal como de dos a aproximadamente ocho glicinas u otros restos de aminoácidos, que conecta la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Dichos péptidos enlazadores se consideran de origen humano.

Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquier subclase de las mismas. Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificado en los genes de la región constante de la cadena pesada. En seres humanos, hay cinco isotipos de cadena pesada y dos isotipos de cadena ligera. Para la cadena pesada, IgA1 y 2; IgD; IgG1, 2, 3 y 4; IgE; e IgM son isotipos de cadenas pesadas. Kappa y lambda son isotipos de cadenas ligeras. En ciertas realizaciones, la cadena pesada es una cadena pesada de clase IgG. En otras realizaciones, la cadena pesada es una cadena pesada de clase IgM. En ciertas realizaciones, la cadena pesada comprende además al menos aproximadamente 8 aminoácidos de una región J.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) frente a anticuerpos que pueden marcarse en forma soluble o unida, y fragmentos, regiones o derivados de los mismos, proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como, pero sin limitaciones, escisión enzimática, síntesis de péptidos o técnicas recombinantes. Tales anticuerpos pueden ser capaces de unir partes de un antígeno (por ejemplo, TNF) que inhiben la unión del antígeno a los receptores de antígeno.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno.

Un anticuerpo monoclonal (mAb) contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos para un antígeno. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión para un epítipo particular.

Los mAb se pueden obtener por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); patente de Estados Unidos n.º 4376,110; Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1987, 1992); y Harlow and Lane *ANTIBODIES: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993).

Un anticuerpo antiidiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. El anticuerpo anti-Id también puede usarse como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal más, produciendo un denominado anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al mAb original que indujo el anti-Id. De este modo, usando anticuerpos para los determinantes idiotípicos de un mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica.

Los fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. Estos fragmentos carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión no específica del tejido que un anticuerpo intacto (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316–325 (1983)). Estos fragmentos se producen a partir de anticuerpos intactos usando procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo mediante escisión proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a la porción de una molécula de anticuerpo que contiene los restos de aminoácidos que interaccionan con un antígeno y confieren al anticuerpo su especificidad y afinidad por el antígeno. Un "antígeno" es una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse a un anticuerpo que es además capaz de inducir a un animal a producir un anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo. La región de anticuerpo incluye los restos de aminoácidos "marco" necesarios para mantener la conformación apropiada de los restos de unión a antígeno.

Un "fragmento de unión a antígeno" o una porción del mismo incluye, por ejemplo, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb en el que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica; y (vi) una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) aisladas. Tales fragmentos pueden producirse por escisión enzimática, técnicas sintéticas o recombinantes, como se conoce en la técnica y/o como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, los fragmentos pueden incluir una o más porciones de la cadena del anticuerpo, tales como las regiones constante, de unión, diversidad o variable de la cadena pesada o las regiones constante, de unión o variable de la cadena ligera.

La región de unión al antígeno puede ser no humana, por ejemplo, de origen murino. En algunas realizaciones, la región de unión al antígeno puede derivar de un conejo o un roedor, tal como una rata o un hámster.

Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo quimérico puede derivar de un anticuerpo no humano específico de un antígeno humano. En algunas realizaciones, las fuentes para el ADN que codifica dicho anticuerpo quimérico incluyen líneas celulares que producen anticuerpos, preferentemente líneas celulares híbridas conocidas habitualmente como hibridomas. En una realización, el hibridoma es la línea celular de hibridoma A2.

El término "epítipo" significa un determinante de proteína capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos consisten habitualmente en agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y, por lo general, tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un "epítipo" puede ser la porción de cualquier molécula capaz de ser reconocida por un anticuerpo y unida a un anticuerpo en una o más de las regiones de unión al antígeno de Ab. Por "epítipo de inhibición y/o neutralizante" se entiende un epítipo, que, cuando está unido por un anticuerpo, da como resultado la pérdida de la actividad biológica de la molécula u organismo que contiene el epítipo, *in vivo*, *in vitro* o *in situ*, más preferentemente *in vivo*, por ejemplo, unión de TNF a un receptor de TNF.

Los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos aislados, recombinantes y/o sintéticos.

Un "anticuerpo recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes. La expresión "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped") se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Las células huésped recombinantes incluyen, por ejemplo, líneas celulares de CHO o una línea celular SP2/0 derivada de mieloma de ratón. Los anticuerpos recombinantes, tales como los anticuerpos murinos o quiméricos murino-humano o humano-humano se pueden producir usando técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, N.Y. (1987, 1992, 1993); y Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

Los anticuerpos, fragmentos o derivados que tienen cadenas H y cadenas L quiméricas con la misma o diferente especificidad de unión a la región variable, se pueden preparar, por ejemplo, mediante la asociación apropiada de las cadenas polipeptídicas individuales, de acuerdo con etapas conocidas, por ejemplo, de acuerdo con Ausubel, citado anteriormente, Harlow citado más adelante, y Colligan, citado más adelante.

Con este enfoque, los huéspedes que expresan cadenas H quiméricas (o sus derivados) se cultivan por separado a partir de huéspedes que expresan cadenas L quiméricas (o sus derivados), y las cadenas de inmunoglobulina se recuperan por separado y luego se asocian. Como alternativa, los huéspedes pueden cocultivarse y las cadenas pueden asociarse espontáneamente en el medio de cultivo, seguido de la recuperación de la inmunoglobulina, fragmento o derivado ensamblados.

Las células híbridas se forman mediante la fusión de una célula productora de anticuerpos anti-hTNF α no humanos, típicamente una célula de bazo de un animal inmunizado contra TNF humano natural o recombinante, o un fragmento peptídico de la secuencia de proteína de TNF α humano. Como alternativa, la célula productora de anticuerpo anti-TNF α no humano puede ser un linfocito B obtenido de la sangre, bazo, ganglios linfáticos u otro tejido de un animal inmunizado con TNF.

El segundo compañero de fusión, que proporciona la función de immortalización, puede ser una célula linfoblastoide o una célula de plasmacitoma o mieloma, que no es en sí misma una célula productora de anticuerpos, pero es maligna. En algunas realizaciones, las células compañeras de fusión incluyen el hibridoma SP2/0-Ag14, abreviado a SP2/0 (ATCC CRL1581) y el mieloma P3X63Ag8 (ATCC TIB9), o sus derivados. Véase, por ejemplo, Ausubel, citado más adelante, Harlow, citado más adelante, y Colligan, citado más adelante.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo de un antígeno humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o sustancias químicas.

Los procedimientos para determinar la especificidad y afinidad de mAb mediante inhibición competitiva se pueden encontrar, por ejemplo, en Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589–601 (1983).

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo biológicamente activo. Los anticuerpos biológicamente activos tienen una actividad específica de al menos 20 %, 30 % o 40 %, y, preferentemente, al menos 50 %, 60 % o 70 %, y, lo más preferentemente, al menos 80 %, 90 % o 95 %-100 % de la del anticuerpo nativo (no sintético), endógeno o relacionado y conocido. Los procedimientos para analizar y cuantificar las medidas de la actividad enzimática y la especificidad del sustrato son bien conocidos por los expertos en la técnica.

30 **Anticuerpos anti-TNF α**

En algunas realizaciones, los anticuerpos producidos por los procedimientos descritos en el presente documento son anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral- α (TNF α). Como se usa en el presente documento, el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) y el factor de necrosis tumoral (TNF) se usan indistintamente para hacer referencia al factor de necrosis tumoral α (TNF α), a menos que se indique específicamente lo contrario. Asimismo, anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) y contra el factor de necrosis tumoral y anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral α (TNF α) y anti-factor de necrosis tumoral (TNF) se usan indistintamente, a menos que se indique específicamente lo contrario.

El TNF α es un homotrímero soluble de subunidades proteicas de 17 kD (Smith, et al., *J. Biol. Chem.* 262:6951–6954 (1987)). También existe una forma precursora de TNF de 26 kD unida a la membrana (Kriegler et al., *Cell* 53:45–53 (1988)). Para revisiones del TNF, véase Beutler, et al., *Nature* 320:584 (1986), Old, *Science* 230:630 (1986) y Le, et al., *Lab. Invest.* 56:234. La secuencia primaria completa del TNF α humano, de acuerdo con Pennica et al., *Nature* 312:724–729 (1984) se muestra en la figura 28 (SEQ ID NO:1).

El TNF α puede producir acciones proinflamatorias que dan lugar a daños tisulares. El factor de necrosis tumoral (TNF α) participa o está implicado en muchas patologías, tales como, pero sin limitaciones, infecciones bacterianas, virales o parasitarias, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes, neoplasias malignas y/o enfermedades neurodegenerativas. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los anticuerpos tienen actividad neutralizante y/o inhibidora contra el TNF.

En algunas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos anti-TNF quiméricos humanos-murinos de alta afinidad, y fragmentos o regiones de los mismos, que tienen una potente actividad inhibidora y/o neutralizante *in vivo* contra el TNF α humano. Dichos anticuerpos y anticuerpos quiméricos pueden incluir los generados por inmunización usando hTNF α recombinante purificado (SEQ ID NO: 1) o fragmentos peptídicos de los mismos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos se unen específicamente a TNF α . En algunas realizaciones, también pueden disminuir, bloquear, derogar, interferir, prevenir y/o inhibir la síntesis de ARN de TNF, ADN o proteínas, la liberación de TNF, la señalización de receptores de TNF, la escisión de TNF de membrana, la actividad de TNF, la producción de TNF y/o la síntesis *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo*.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es cA2. El anticuerpo quimérico cA2 consiste en la región variable de unión al antígeno del anticuerpo frente a TNF α IgG1 antihumano de ratón neutralizante de alta afinidad, designado A2, y las regiones constantes de una inmunoglobulina IgG1 humana, kappa. La región Fc de IgG1 humana mejora la función efectora de anticuerpos alogénicos, aumenta la semivida en suero circulante y disminuye la inmunogenicidad del anticuerpo. La avidéz y la especificidad del epítipo del anticuerpo quimérico cA2 deriva de la región variable del

anticuerpo murino A2. En una realización en particular, una fuente para ácidos nucleicos que codifica la región variable del anticuerpo murino A2 es la línea celular de hibridoma A2.

5 En una realización, el anticuerpo monoclonal murino A2 se produce en una línea celular denominada c134A. En una realización, el anticuerpo quimérico cA2 se produce en una línea celular denominada c168A.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender al menos una de CDR3 de cadena pesada de cA2 y/o CDR3 de cadena ligera de cA2. En una realización en particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede tener una región de unión a antígeno que comprende al menos una porción de al menos una CDR de cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y/o CDR3) que tienen la secuencia de aminoácidos de las correspondientes CDR 1, 2 y/o 3 de cA2. En otra realización en particular, el anticuerpo o la porción o variante de unión a antígeno puede tener una región de unión a antígeno que comprende al menos una porción de al menos una CDR de cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y/o CDR3) que tienen la secuencia de aminoácidos de las correspondientes CDR 1, 2 y/o 3 de cA2. En una realización, las tres CDR de cadena pesada y las tres CDR de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tienen la secuencia de aminoácidos de las correspondientes CDR de al menos uno de mAb A2 o cA2, como se describe en el presente documento.

20 La avidéz y la especificidad del epítipo del A2 quimérico derivan de la región variable del A2 murino. En un ELISA en fase sólida, se ha observado la competencia cruzada para TNF entre los A2 quimérico y murino, lo que indica una especificidad de epítipo idéntica de cA2 y A2 murino. La especificidad de cA2 para TNF- α se confirmó por su incapacidad para neutralizar los efectos citotóxicos de la linfotóxina (TNF- β). El A2 quimérico neutraliza el efecto citotóxico del TNF humano tanto natural como recombinante de una manera dependiente de la dosis. A partir de ensayos de unión de cA2 y TNF humano recombinante, se calculó que la constante de afinidad de cA2 era $1,8 \times 10^9$ M⁻¹.

25 Los procedimientos de detección selectiva que pueden usarse para determinar la actividad neutralizante de TNF de un compuesto neutralizante de TNF pueden incluir ensayos *in vitro* o *in vivo*. Dichos ensayos *in vitro* pueden incluir un ensayo de citotoxicidad de TNF, tal como un radioinmunoensayo, que determina una disminución de la muerte celular por contacto con el TNF, tal como TNF de chimpancé o humano en forma aislada o recombinante, donde la presencia concurrente de un compuesto neutralizante de TNF reduce el grado o la velocidad de la muerte celular. La muerte celular puede determinarse usando valores de DI₅₀ que representan la concentración de un compuesto neutralizante de TNF que disminuye la velocidad de la muerte celular en un 50 %. Por ejemplo, se encuentra que los mAb A2b y cA2 tienen una DI₅₀ de aproximadamente 17 mg/ml +/- 3 mg/ml, tal como 14-20 mg/ml, o cualquier intervalo o valor en el mismo.

35 En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden inhibir competitivamente *in vivo* la unión al TNF α humano del mAb A2 murino anti-TNF α , el mAb cA2 quimérico, o un anticuerpo que tiene sustancialmente las mismas características de unión específica, por ejemplo, especificidad epitópica, como A2 y/o cA2.

40 Los epítipos reconocidos por anticuerpos, y fragmentos y regiones de los mismos, pueden incluir 5 o más aminoácidos que comprenden al menos un aminoácido de cada una o ambas de las siguientes secuencias de aminoácidos del TNF, que proporcionan un epítipo topográfico o tridimensional del TNF que es reconocido por un anticuerpo frente al TNF, y/o se une con actividad anti-TNF al mismo, o fragmentos del mismo:

59-80: Tyr-Ser-Gln-Val-Leu-Phe-Lys-Gly-Gln-Gly-
Cys-Pro-Ser-Thr-His-Val-Leu-Leu-Thr-His-
45 Thr-Ile (AA 59-80 of SEQ ID NO:1);

y

87-108: Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-Leu-Leu-Ser-Ala-
Ile-Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-
50 Glu-Gly (AA 87-108 of SEQ ID NO:1).

55 En algunas realizaciones, los anticuerpos, fragmentos y regiones de los anticuerpos anti-TNF reconocen epítipos que incluyen 5 aminoácidos que comprenden al menos un aminoácido de los restos de aminoácidos 87-108 o ambos restos 59-80 y 87-108 del hTNF α (de SEQ ID NO:1). En algunas realizaciones, los anticuerpos, fragmentos y regiones de anticuerpos anti-TNF no reconocen epítipos de al menos uno de los aminoácidos 11-13, 37-42, 49-57 o 155-157 de hTNF α (de SEQ ID NO:1). (El supuesto locus de unión al receptor presentado por Eck y Sprang (J. Biol. Chem. 264 (29): 17595-17605 (1989)).

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico anti-hTNF que comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, comprendiendo cada una de las cadenas al menos parte de una región constante humana y al

menos parte de una región variable (V) de origen no humano que tiene especificidad por el TNF humano, uniéndose dicho anticuerpo con alta afinidad a un epítipo inhibitor y/o neutralizante de TNF humano.

5 En una realización, el antígeno es para su uso en procedimientos diagnósticos para detectar el TNF en pacientes o animales de los que se sospecha que sufren afecciones asociadas con la producción anormal de TNF. En algunas realizaciones, los anticuerpos frente al TNF se usan para aliviar síntomas o patologías que implican TNF, tales como, por ejemplo, infecciones bacterianas, virales o parasitarias, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes, neoplasias malignas y/o enfermedades neurodegenerativas.

10 Los hibridomas murinos que producen mAb específico para TNF α o TNF β humanos se forman mediante la fusión de una célula compañera de fusión de ratón, tal como SP2/0, y células de bazo de ratones inmunizados contra hTNF α purificado, hTNF α recombinante, péptidos de TNF naturales o sintéticos, incluidos péptidos que incluyen 5 o más aminoácidos seleccionados de los restos 59-80 y 87-108 de TNF (de SEQ ID NO:1) u otras preparaciones biológicas que contienen TNF. Para inmunizar los ratones, se pueden seguir diversos protocolos convencionales. Por ejemplo, 15 los ratones pueden recibir inmunizaciones primarias y de refuerzo de TNF.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden unirse al TNF humano con una amplia gama de afinidades (K_D). En una realización preferida, al menos un mAb se puede unir opcionalmente al TNF humano con alta afinidad. Por ejemplo, un mAb humano puede unirse al TNF humano con una K_D igual o menor que 20 aproximadamente 10^{-7} M, tal como, pero sin limitaciones, 0,1-9,9 (o cualquier intervalo o valor en el mismo) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} o cualquier intervalo o valor en el mismo.

La afinidad o avidéz de un anticuerpo por un antígeno se puede determinar experimentalmente usando cualquier procedimiento adecuado. (Véase, por ejemplo, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions", en Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: Nueva York, NY (1992)); y procedimientos descritos en el presente documento). La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno en particular puede variar si se mide en diferentes condiciones (por ejemplo, concentración de sal, pH). Por lo tanto, las medidas de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno (por ejemplo, K_D , K_a , K_d) se preparan, preferentemente, con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado, tal como el tampón descrito en el presente documento. 25 30

El anticuerpo anti-TNF puede comprender al menos una de una región variable de cadena pesada o ligera que tiene una secuencia de aminoácidos definida. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo anti-TNF comprende al menos una de al menos una región variable de cadena ligera, que tiene opcionalmente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 y/o al menos una región variable de cadena pesada, que tiene opcionalmente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5. Los anticuerpos que se unen al TNF humano y que comprenden una región variable definida de cadena pesada o ligera se pueden preparar usando procedimientos adecuados, tales como presentación en fagos (Katsube, Y., et al., Int J Mol. Med, 1(5):863-868 (1998)) o procedimientos que usan animales transgénicos, como se conoce en la técnica y/o como se describe en el presente documento. En una realización, el anticuerpo anti-TNF comprende las secuencias de CDR de cadenas ligera CDR1, CDR2 y CDR3 correspondientes a los restos de aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de SEQ ID NO: 3, respectivamente, y las CDR de cadena pesada HCDR1, HCDR2 y HCDR3 correspondientes a los restos de aminoácidos 31-35, 50-68 y 101-109 de SEQ ID NO: 5, respectivamente, delineados de acuerdo con Kabat. 35 40

Un anticuerpo anti-TNF puede comprender, opcionalmente, un polipéptido de al menos uno de 70-100 % de los aminoácidos contiguos de al menos una de las SEQ ID NO:3 y 5. 45

En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina, o una porción de la misma (por ejemplo, región variable, CDR) tiene aproximadamente 70-100 % de identidad (por ejemplo, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o cualquier intervalo o valor en el mismo) con la cadena correspondiente de al menos una de las SEQ ID NO:3 y 5. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera se puede comparar con la secuencia de la SEQ ID NO:8 o la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de cadena pesada se puede comparar con la SEQ ID NO:7. Preferentemente, el 70-100 % de identidad de aminoácidos (es decir, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o cualquier intervalo o valor en el mismo) se determina usando un algoritmo informático adecuado, como se conoce en la técnica. 50 55

Ejemplos de secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera se proporcionan en las SEQ ID NO: 3 y 5. Los anticuerpos pueden comprender cualquier número de restos de aminoácidos contiguos, en los que dicho número se selecciona del grupo de números enteros que consiste en 10-100 % del número de restos contiguos en un anticuerpo anti-TNF. Opcionalmente, esta subsecuencia de aminoácidos contiguos tiene al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 o más aminoácidos de longitud, o cualquier intervalo o valor en el mismo. Además, el número de tales subsecuencias puede ser cualquier número entero seleccionado del grupo que consiste de 1 a 20, tal como al 60 65 menos 2, 3, 4 o 5.

Los anticuerpos también anticuerpos inhibidores y/o neutralizantes de TNF de alta afinidad y/o potentes *in vivo*, fragmentos o regiones de los mismos, tanto para inmunoensayos de TNF como para terapia de patología mediada por TNF. Tales anticuerpos, fragmentos o regiones preferentemente tendrán una afinidad por hTNF α , expresada como K_a , de al menos $10^8 M^{-1}$, más preferentemente, de al menos $10^9 M^{-1}$, como $10^8-10^{10} M^{-1}$, $5 \times 10^8 M^{-1}$, $8 \times 10^8 M^{-1}$, $2 \times 10^9 M^{-1}$, $4 \times 10^9 M^{-1}$, $6 \times 10^9 M^{-1}$, $8 \times 10^9 M^{-1}$, o cualquier intervalo o valor en el mismo.

Los anticuerpos contra el TNF también incluyen anticuerpos murinos y quiméricos de alta afinidad, y fragmentos, regiones y derivados que tienen una potente actividad *in vivo* inhibidora y/o neutralizante del TNF α que bloquea la secreción de IL-6 inducida por TNF. En algunas realizaciones, los anticuerpos para usos terapéuticos humanos incluyen anticuerpos anti-TNF α murinos y quiméricos de alta afinidad, y fragmentos, regiones y derivados de los mismos, que bloquean la actividad procoagulante inducida por TNF, incluyendo el bloqueo de la expresión de moléculas de adhesión celular inducida por TNF, tal como ELAM-1 e ICAM-1 y el bloqueo de la actividad mitogénica de TNF, *in vivo*, *in situ* e *in vitro*.

En la técnica se describen ejemplos adicionales de anticuerpos monoclonales anti-TNF (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.231.024; Moller, A. et al., Cytokine 2(3):162-169 (1990); la solicitud de Estados Unidos n.º 07/943.852 (presentada el 11 de septiembre de 1992); Rathjen et al., publicación internacional n.º documento WO 91/02078 (publicado el 21 de febrero de 1991); Frotar et al., publicación de patente EPO n.º 0 218 868 (publicado el 22 de abril de 1987); Yone et al., publicación de patente EPO n.º 0 288.088 (26 de octubre de 1988); Liang, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 137:847-854 (1986); Meager, et al., Hybridoma 6:305-311 (1987); Fendly et al., Hybridoma 6:359-369 (1987); Bringman, et al., Hybridoma 6:489-507 (1987); y Hirai, et al., J. Immunol. Meth. 96:57-62 (1987)).

Los resultados de los ejemplos que se describen a continuación demuestran varios hallazgos importantes:

la eliminación de CTL se puede controlar a menos del nivel máximo mediante el control de Zn²⁺ extracelular. Por ejemplo, como lo demuestran los brazos experimentales en el experimento SMF-10.1, el experimento DOE3, el experimento de mezcla de BSA n.º 1 y el experimento de mezcla de BSA n.º 2 descrito a continuación, el contenido de CTL puede controlarse dentro de un intervalo (por ejemplo, de 40 a 70 %) controlando la concentración extracelular de Zn²⁺ a un valor de $\leq 1,2 \mu M$. Además, como se ha demostrado en el Experimento DOE3, es posible controlar un mayor intervalo de contenido de CTL con concentraciones más altas de Zn²⁺ hasta $6,3 \mu M$.

Además, como lo demuestran los brazos experimentales en el experimento DOE3, el experimento de mezcla de BSA n.º 1 y el experimento de mezcla de BSA n.º 2, dentro de un intervalo de concentración extracelular de Zn²⁺, el contenido de CTL se puede controlar además controlando [EDTA] extracelular o [EDTA - Fe³⁺].

Además, el contenido de ácido siálico puede controlarse a menos del nivel máximo mediante el control de Zn²⁺ extracelular. Por ejemplo, como lo demuestran los brazos experimentales en el Experimento DOE3, el experimento de mezcla de BSA n.º 1 y el experimento de mezcla de BSA n.º 2, el ácido siálico puede controlarse dentro de un intervalo (por ejemplo, 4 a 13 %) controlando la concentración extracelular de Zn²⁺ a un valor de $\leq 1,2 \mu M$. Además, como se ha demostrado en el experimento DOE3, es posible controlar un intervalo más alto del contenido de ácido siálico con concentraciones más altas de Zn²⁺ hasta $6,3 \mu M$.

Además, como se ha demostrado en el Experimento DOE3, el experimento de mezcla de BSA n.º 1 y el experimento de mezcla de BSA n.º 2, dentro de un rango de concentración de Zn²⁺ extracelular, el contenido de ácido siálico puede controlarse adicionalmente controlando [EDTA] extracelular o [EDTA-Fe³⁺].

Además, como se ha demostrado en el experimento SFM-10.3 y el experimento DOE3, la producción de anticuerpos también se puede controlar controlando la concentración extracelular de Zn²⁺.

El control de las concentraciones de Zn²⁺, Fe³⁺ y EDTA para lograr el control de la adición de ácido siálico, la eliminación de CTL y la producción de anticuerpos se puede lograr a través de diversos medios, incluidos cualquiera de los siguientes, solos o en combinación: 1) Adición directa de Zn²⁺, Fe³⁺ y EDTA al medio de cultivo, 2) mediante la mezcla de materias primas que tienen Zn²⁺, Fe³⁺ o EDTA como componentes, 3) mediante el tratamiento de las materias primas para ajustar las concentraciones de Zn²⁺, Fe³⁺ o EDTA y/o 4) mediante la modificación de los procedimientos de fabricación de las materias primas complejas para alcanzar los niveles deseados de Zn²⁺, Fe³⁺ y/o EDTA

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Los experimentos descritos en el presente documento se realizaron en biorreactores Applikon® de 3l controlados, con condiciones de funcionamiento que se ha demostrado que proporcionan resultados que son representativos del procedimiento comercial de infliximab.

El día indicado, infliximab se purificó mediante captura directa del producto (DPC) usando una columna de proteína A. A continuación, se caracterizó mediante isoelectroenfoque capilar (cIEF) o el ensayo WAX. El infliximab que se ha purificado mediante DPC usando una columna de Proteína A se denomina en el presente documento "muestra de DPC" o "fracción eluida de DPC".

5

Ejemplo 1 - El procedimiento cIEF

Se usó cIEF para calcular el contenido de CTL de los oligosacáridos de infliximab. Hay tres fuentes de heterogeneidad de carga evidente en el análisis de infliximab pre-formulado a granel (PFB): (1) variabilidad de CTL; (2) contenido de ácido siálico; y (3) desamidación. Las fracciones eluidas típicas de infliximab de muestras de biorreactores comerciales tempranos, medios y tardíos muestran la eliminación de CTL de la cadena pesada de infliximab de aproximadamente 30 % a 80 %, con una eliminación promedio de CTL en el PFB de aproximadamente 40 % a 60 %. La CTL de la cadena ligera no está sujeta a eliminación. La eliminación de CTL tiende a ser menor para las muestras de biorreactores tempranos y aumenta para las muestras de biorreactores intermedios y tardíos. Las fracciones eluidas típicas de infliximab de muestras de biorreactores tempranos y tardíos exhiben contenidos de ácido siálico de aproximadamente 3 % a 14 % de los oligosacáridos de IgG. La adición de ácido siálico es típicamente más baja para las muestras de biorreactores tempranos y más alta para las muestras de biorreactores intermedios y tardíos. El mapeo de péptidos en fase inversa reveló niveles bajos y consistentes de desamidación en varios sitios de desamidación para infliximab en la cadena pesada y la cadena ligera.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Esta heterogeneidad de carga generalmente conduce a 4 a 6 picos en un electroferograma cIEF. El pico 1 corresponde a infliximab que no contiene cargas en exceso; es decir, este pico o banda contiene lisinas C-terminales, nada ácido siálico y nada de desamidación. El segundo, tercer, cuarto, quinto y sexto picos o bandas contienen 1, 2, 3, 4 y 5 cargas en exceso, respectivamente, debido a una combinación de eliminación de CTL, adición de ácido siálico y desamidación.

La figura 1 es un electroferograma de cIEF de una muestra de infliximab y muestra los valores de pI para los picos 1-6.

Debido al nivel relativamente alto de eliminación de CTL, el bajo nivel de adición de ácido siálico y la consistencia de la desamidación, el porcentaje relativo del pico 1 está altamente correlacionado con la eliminación de CTL. La figura 2 es un gráfico de línea ajustada del porcentaje de des-lisina (des-Lys) como una función del porcentaje del pico 1 y muestra la correlación entre el contenido de CTL (expresado como porcentaje de des-Lys) y el porcentaje del pico 1 a través de un intervalo de condiciones experimentales. La correlación representada en la figura 2 se creó a partir de muestras de infliximab para las que se determinó el porcentaje de des-Lys mediante el mapeo de péptidos y se determinó el porcentaje del Pico 1 mediante cIEF.

La eliminación de CTL se expresa en el presente documento como el porcentaje de cadenas pesadas que poseen una lisina C-terminal y se puede calcular usando la ecuación siguiente: contenido de CTL (%) = (número de cadenas pesadas que poseen una CTL)/(número total de cadenas pesadas) x 100. La eliminación de CTL se expresa en el presente documento como el porcentaje de cadenas pesadas que carecen de lisina en C-terminal (des-Lys). Por tanto, "80 % de Des-Lys" es equivalente a 20 % de contenido de CTL. La correlación entre el porcentaje de des-Lisina y el porcentaje del Pico 1 (medido por cIEF) se mantiene para las muestras de infliximab que muestran porcentajes típicos de eliminación de CTL, adición de ácido siálico y desamidación. Esta correlación, por lo tanto, se aplicaría a los experimentos descritos en el presente documento porque: (1) la adición de ácido siálico mediante WAX se ha determinado para muchas de las muestras de DPC de estos experimentos y los resultados indican que el ácido siálico se mantenía en el intervalo típico de 3 % para muestras de biorreactores tempranos a aproximadamente 14 % para muestras de biorreactores tardíos (es decir, el porcentaje de ácido de ácido siálico permaneció en el intervalo de los datos empleados para generar la correlación de la figura 1); y (2) es razonable suponer que los porcentajes de desamidación permanecieron bajos y consistentes, como fue el caso de las muestras experimentales empleadas para generar la correlación de la figura 1.

La eliminación de CTL en estos experimentos varió desde los valores típicos de 30-60 % a valores más altos. En estas condiciones, la eliminación de CTL continuaría siendo el determinante dominante del porcentaje del Pico 1.

55

Ejemplo 2: el ensayo WAX

El ensayo WAX se utilizó para determinar el contenido de ácido siálico y el contenido de galactosa de los oligosacáridos de infliximab. En el ensayo, se liberan los oligosacáridos ligados a N de la IgG usando PNGasa F, luego se derivatizan usando una solución de ácido antranílico y cianoborohidruro de sodio. Las muestras se purifican usando filtros ACRODISC® de nailon de 0,45 micrómetros y se analizan en una HPLC Agilent 1100 con un detector de fluorescencia. Las identidades máximas se resuelven usando patrones de N-glucano disponibles comercialmente.

60

65

En el ensayo de WAX descrito en el presente documento, el componente 5A es el porcentaje de oligosacáridos de infliximab que contienen ácido siálico. El componente 1 está altamente correlacionado con el porcentaje de

65

oligosacáridos de infliximab que carecen de galactosa. Por lo tanto, (100 - porcentaje del Componente 1) representa una estimación razonable del porcentaje de oligosacáridos de infliximab que contienen galactosa.

5 En la cadena pesada de infliximab, un resto de asparagina (Asn) está glicosilado con un oligosacárido, que puede contener, por ejemplo, uno o dos restos de galactosa y uno o dos restos de ácido siálico. El contenido de galactosa de infliximab se expresa en el presente documento como el porcentaje de oligosacáridos que contienen galactosa y puede calcularse usando la siguiente ecuación: contenido de galactosa (%) = (número de oligosacáridos que contienen galactosa)/(número total de oligosacáridos) x 100. Esta ecuación se aplica independientemente del número de unidades de galactosa en el oligosacárido. En otras palabras, independientemente de si hay, por ejemplo, uno o dos restos de galactosa en el oligosacárido, el oligosacárido solo se cuenta una vez con el fin de calcular el contenido de galactosa.

15 El contenido de ácido siálico de infliximab se expresa en el presente documento como el porcentaje de oligosacáridos que contienen ácido siálico y puede calcularse usando la siguiente ecuación: contenido de ácido siálico (%) = (número de oligosacáridos que contienen un ácido siálico)/(número total de oligosacáridos) x 100. Esta ecuación se aplica independientemente del número de restos de ácido siálico en el oligosacárido. En otras palabras, independientemente de si hay, por ejemplo, uno o dos restos de ácido siálico en el oligosacárido, el oligosacárido solo se cuenta una vez con el fin de calcular el contenido de ácido siálico.

20 Típicamente, ambas cadenas pesadas de infliximab están glicosiladas. Sin embargo, en algunas circunstancias, algunas de las cadenas pesadas permanecen aglicosiladas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, aproximadamente el 94 % de las moléculas de infliximab están glicosiladas en ambas cadenas, aproximadamente el 6 % de las moléculas de infliximab están hemiglicosiladas y aproximadamente el 0,1 % de las moléculas de infliximab están completamente aglicosiladas.

25 La relación entre ácido siálico y galactosa se calcula a partir de la relación molar entre ácido siálico y galactosa en los oligosacáridos de infliximab.

30 Ejemplos 3 - Estudios de retención de cosecha

Se realizaron dos estudios en los que se retuvo la cosecha de infliximab sin células durante períodos prolongados. El propósito de estos estudios fue entender si la eliminación de CTL podría producirse extracelularmente (es decir, después de la secreción).

35 Se sabe que el ácido siálico se añade a las glicoproteínas intracelularmente, antes de la secreción. Sin embargo, se ha indicado la extracción extracelular de ácido siálico de glicoproteínas recombinantes secretadas para cultivos de células de ovario de hámster chino (CHO). Para las células CHO, la sialidasa se libera en el medio extracelular desde las células lisadas. Por lo tanto, un segundo objetivo de estos estudios de retención de la cosecha fue aclarar si existe una eliminación extracelular de ácido siálico en la cosecha sin células para el procedimiento de infliximab.

40 Un estudio de retención de la cosecha utilizando la cosecha de biorreactores a escala de fabricación demostró que la retención de la cosecha en diferentes condiciones (cosecha aclarada sin células retenida durante 30 días a 2 a 14 °C; cosecha no aclarada retenida durante 14 días a 2-8 °C) y variando las edades del biorreactor no tuvieron impacto en el perfil de gel de cIEF del infliximab.

45 Para reforzar estos resultados, se realizó otro estudio de retención de la cosecha. La cosecha sin células de infliximab se cosechó a partir de dos biorreactores. Para cada biorreactor, una parte de la cosecha se purificó inmediatamente mediante cromatografía de Proteína A para producir la fracción eluida de DPC. La otra parte de la cosecha se almacenó durante 7 días a temperaturas entre 10-14 °C (una temperatura de almacenamiento típica), antes de procesar a una fracción eluida de DPC. La temperatura de la cosecha retenida se monitorizó con una sonda en un refrigerador y se controló mediante ajuste manual. Las cuatro muestras de fracción eluida de DPC se analizaron después mediante cIEF para detectar cualquier evidencia de cambio en la distribución de carga que indicara la eliminación de CTL o ácido siálico en la cosecha.

55 Este estudio de retención no reveló diferencias significativas en los patrones de cIEF para las fracciones eluidas de DPC obtenidas inmediatamente de la cosecha o de la cosecha retenida durante 7 días a una temperatura de 10-12 °C antes de la purificación en proteína A.

60 Los estudios de retención de la cosecha demuestran que la eliminación de CTL de la cadena pesada de infliximab probablemente se produce intracelularmente. Asimismo, el contenido de ácido siálico de los oligosacáridos de infliximab se determina intracelularmente.

Ejemplo 4 - El experimento SFM-10.1

El término SFM-10.1 corresponde a infliximab SFM-10 medio que carece de BSA y líquido CM2 (Parte B) líquido (incluida la insulina que contiene cinc). El propósito del experimento SFM-10.1 era investigar el impacto de la suplementación de Zn^{+2} sobre la producción de infliximab.

- 5 Las cuatro condiciones experimentales representan medio SFM-10.1 suplementado con heptahidrato de sulfato de cinc, que se añadió en una cantidad suficiente para añadir 0,25, 0,5, 1,0 o 2,0 μM de Zn^{+2} a la concentración final del medio. La concentración total de Zn^{+2} en cada experimento fue la suma de esta suplementación más el Zn^{+2} aportado por PRIMATONE® (disponible de Kerry Ingredients and Flavors, Beloit, WI), que se determinó que era 0,49 μM (basado en el análisis de metales). Por lo tanto, se ha estimado razonablemente que las concentraciones totales
10 de cinc en estos cuatro biorreactores eran 0,74, 1,0, 1,5 y 2,5 μM . La concentración de Fe^{+3} en estos biorreactores fue de 5,8 μM , en base al análisis de metales del lote de PRIMATONE® empleado. Se estima que la concentración de EDTA es 2 μM , aportada por la transferrina. EDTA tiene una afinidad mucho más fuerte por Fe^{+3} que por Zn^{+2} y otros cationes divalentes. Por lo tanto, el cálculo de [EDTA – Fe^{+3}] puede representar la concentración de EDTA que está disponible para quelar Zn^{+2} . Por lo tanto, en este primer conjunto de experimentos, se puede esperar que
15 no haya EDTA libre disponible para unir Zn^{2+} extracelular.

Tabla 1. Concentraciones de Zn^{+2} , Fe^{+3} , EDTA y [EDTA - Fe^{+3}] en los cuatro biorreactores del experimento SFM-10.1 (las concentraciones están en μM).

Brazo de biorreactor	[Zn^{+2}]	[Fe^{+3}]	[EDTA]	[EDTA – Fe]
Zn: 0,74 μM	0,74	5,8	2	-3,8
Zn: 1,0 μM	0,99	5,8	2	-3,8
Zn: 1,5 μM	1,5	5,8	2	-3,8
Zn: 2,5 μM	2,5	5,8	2	-3,8

- 20 La figura 3 es un gráfico de la eliminación de CTL (expresado como el porcentaje de des-Lys y calculado utilizando el procedimiento de cIEF de los datos del pico 1) como una función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de concentraciones variables de Zn^{+2} sobre la eliminación de CTL. Los biorreactores con concentraciones totales de Zn^{+2} de aproximadamente 1,5 y 2,5 μM exhibieron un 70 % a 80 % de eliminación de CTL en todos los puntos temporales. No hay cambios en la distribución de la carga en función de la edad del biorreactor, ya que todos los puntos de tiempo (muestras de biorreactores tempranos, medios y tardíos) tienen una alta eliminación de CTL. El biorreactor con una concentración de Zn^{+2} de 1,0 μM exhibió un 60 % de eliminación de CTL temprano en el estudio y aproximadamente un 70 % de eliminación en los puntos de muestra medios y tardíos. El biorreactor con una
30 concentración de Zn^{+2} de aproximadamente 0,74 μM presentó una eliminación creciente de CTL en función de la edad del biorreactor.

- 35 La figura 4 es un gráfico del porcentaje de oligosacáridos de infliximab con ácido siálico, según lo determinado por el procedimiento WAX, como una función de la edad del biorreactor, y muestra el efecto de concentraciones variables de Zn^{+2} sobre el porcentaje de ácido siálico. La figura 4 muestra que no había una tendencia clara en la adición de ácido siálico en función de la concentración de Zn^{+2} en este experimento.

- 40 No se sabe si esta falta de impacto representa una insensibilidad real del contenido de ácido siálico a la concentración extracelular de Zn^{+2} en el contexto del medio SFM-10.1, si es un reflejo del ruido experimental dado el pequeño número de biorreactores, o si hay podría haber sido un problema de procedimiento con la implementación experimental.

- 45 Las figuras 5-7 son gráficos de la densidad de células viables, la viabilidad del cultivo y la concentración de infliximab, respectivamente, como una función del tiempo, y muestran el efecto de concentraciones variables de Zn^{+2} en el experimento SFM-10.1. Los resultados en el período anterior a alcanzar la densidad de células objetivo aproximadamente el día 15-20 son los más reveladores, ya que esto representa un período en el que cada biorreactor se opera de manera consistente. Después de alcanzar la densidad celular objetivo, las células se eliminan de los cultivos diariamente en un intento de mantener la concentración de las células diana y las variaciones en este procedimiento de eliminación pueden causar fluctuaciones en la densidad celular, la viabilidad
50 del cultivo y la concentración de anticuerpos.

- 55 En el experimento SFM-10.1, el biorreactor con Zn^{+2} 0,74 μM tuvo menor tasa de crecimiento celular, menor viabilidad del cultivo y concentración de anticuerpos más baja antes de alcanzar la densidad celular objetivo que los biorreactores que contienen Zn^{+2} 1,5 y 2,5 μM . El biorreactor con Zn^{+2} 1,0 μM mostró un rendimiento en cada caso que fue intermedio entre los biorreactores con 0,74 μM y los biorreactores con Zn^{+2} 1,5 o 2,5 μM .

Las condiciones de este experimento fueron favorables para la acumulación de Zn+2 por las células SP2/0. El [EDTA-Fe+3] es menor que cero, lo que indica que todo el EDTA se quela a Fe+3 y no está disponible para quelar Zn+2 en el medio extracelular. Además, otro potencial quelante, BSA, estaba ausente del medio.

5 A pesar de estas condiciones favorables para la acumulación de Zn+2, los resultados experimentales indican un impacto de las concentraciones extracelulares de Zn+2 de 0,74 y 1,0 µM sobre la eliminación de CTL, el crecimiento celular inicial, la viabilidad del cultivo y la concentración de anticuerpos, particularmente en los primeros 20 días de la cultivo. Los resultados no muestran un impacto claro de Zn+2 sobre la adición de ácido siálico en las condiciones de este experimento.

10 Aunque no desean estar sujetos a ninguna teoría en particular, estos resultados son consistentes con las siguientes hipótesis:

- 15 • Las células SP2/0 deben acumular Zn+2 intracelular para soportar procedimientos intracelulares asociados con enzimas que tienen requisitos del cofactor de Zn+2. Esto incluye las enzimas responsables de la eliminación de CTL, el crecimiento celular, la división celular y la producción de anticuerpos.
- Las concentraciones de Zn+2 del orden de 0,74 a 1,0 µM no proporcionan suficiente Zn+2 extracelular para suministrar adecuadamente estos procesos intracelulares que requieren Zn+2 durante las etapas iniciales del procedimiento del biorreactor de producción.
- 20 • El efecto es más pronunciado en los primeros 20 días de cultivo. Este es el período en el que la cantidad de Zn+2 intracelular por célula se reduce continuamente debido a la división celular. Es decir, cada vez que una célula se divide, el Zn+2 acumulado se divide entre las células hijas. A 0,74 a 1,0 µM de Zn+2 extracelular, la incorporación celular de Zn+2 no puede seguir el ritmo de la reducción celular de Zn+2 debido a la duplicación celular. Por lo tanto, las células son deficientes en Zn+2 y exhiben crecimiento celular no óptimo, viabilidad del cultivo y productividad del anticuerpo.
- 25 • Después del Día 20, las células están cerca de su densidad celular objetivo para el cultivo de perfusión y la división celular se ralentiza. A partir de ese momento, la velocidad de reducción de Zn+2 intracelular debido a la división celular se ralentiza y la incorporación celular es adecuada para asegurar el aumento de la acumulación de Zn+2 por célula a lo largo del tiempo. En estas condiciones y después del día 20, las células aumentan gradualmente sus reservas intracelulares de Zn+2.
- 30 • Para el biorreactor con 0,74 µM de Zn+2, el patrón de acumulación de Zn+2 en función de la edad del biorreactor es responsable de los cambios observados en el patrón de cIEF en función de la edad del biorreactor. Es decir, la eliminación de CTL es, como mínimo, el día 20, el punto en el cultivo en el que la enzima carboxipeptidasa intracelular será más deficiente en el cofactor de Zn+2 requerido. Después de que la división celular se ralentiza y después del día 20, la eliminación de CTL aumenta debido al aumento de la acumulación de Zn+2, lo que lleva a una mayor función de la carboxipeptidasa.

40 Para los brazos experimentales con Zn+2 1,5 µM y 2,5 µM, la concentración de Zn+2 extracelular es suficientemente alta para que las enzimas celulares no experimenten deficiencia de Zn+2 en cualquier punto del cultivo. Por lo tanto, la eliminación de CTL es muy rápida desde el día 20 hasta el día 60. Asimismo, el crecimiento celular, la viabilidad del cultivo y la producción de anticuerpos proceden a velocidades elevadas en función del día de cultivo.

Ejemplo 5 - El experimento DOE

45 Siguiendo las pistas generadas en el experimento SFM-10.1, se realizó un experimento más detallado utilizando medio SFM-10 infliximab comercial para investigar los impactos de la concentración extracelular de Zn+2, EDTA y Fe+3 en la eliminación de CTL, la adición de ácido siálico, el crecimiento celular, la viabilidad del cultivo y la producción de anticuerpos.

50 Se razonó que la unión extracelular de Zn+2 a EDTA podría inhibir, hipotéticamente, la acumulación intracelular de Zn+2. Dado que el Fe+3 extracelular tendría una afinidad de unión mucho mayor a EDTA que Zn+2, se consideró que el factor clave para determinar la acumulación intracelular de Zn+2 podría ser [EDTA-Fe+3].

55 El experimento DOE3 incluyó doce biorreactores. El medio para este experimento fue el medio comercial SFM-10. Los lotes elegidos de PRIMATONE®, insulina, transferrina y BSA crearon niveles basales de Zn+2 0,76 µM, EDTA 5,9 µM y Fe+3 0,9 µM. Se creó una matriz de condiciones experimentales mediante la suplementación de Zn+2, EDTA y/o Fe+3, como se indica en la Tabla 2.

60 Tabla 2. Concentraciones de Zn+2, Fe+3, EDTA y [EDTA-Fe+ 3] en los doce biorreactores del Experimento DOE3 (las concentraciones están en µM).

Brazo de biorreactor ^a	[Zn+2]	[Fe+3]	[EDTA]	[EDTA – Fe]
"Fe:1 Zn:1 EDTA:6"	0,76	0,90	5,9	5,0
^b "Fe:5 Zn:1 EDTA:10"	0,76	5,4	10,4	5,0

Brazo de biorreactor ^a	[Zn+2]	[Fe+3]	[EDTA]	[EDTA – Fe]
"Fe:1 Zn:1 EDTA:12"	0,76	0,90	11,6	10,7
"Fe:5 Zn:1 EDTA: 16"	0,76	5,4	16,1	10,7
"Fe:1 Zn:1 EDTA:24"	0,76	0,90	23,6	22,7
"Fe:5 Zn:1 EDTA:28"	0,76	5,4	28,1	22,7
"Fe:3 Zn:2 EDTA:9"	1,7	3,2	9,0	5,8
"Fe:3 Zn:2 EDTA: 14(A)"	1,7	3,2	13,8	10,6
"Fe:3 Zn:2 EDTA: 14(B)"	1,7	3,2	13,8	10,6
"Fe:3 Zn:2 EDTA: 14(C)"	1,7	3,2	13,8	10,6
"Fe:3 Zn:2 EDTA:27"	1,7	3,2	26,8	23,6
"Fe:5 Zn:2 EDTA:6"	1,7	5,4	5,9	0,53

^aLos brazos del biorreactor se designan mediante las concentraciones aproximadas de Fe+3, Zn+2 y EDTA (en μM).
^bBiorreactor "Fe:5 Zn:1 EDTA: 10" (M12COO3) experimentó una desviación significativa en el protocolo experimental. Antes del día 13, la concentración de Zn+2 del medio era de 6,3 μM . El día 13, el medio se ajustó al valor objetivo de 0,76 μM . Es decir, este biorreactor se sometió a una concentración muy alta de Zn+2 en el periodo temprano del cultivo celular.

En el experimento DOE3, la concentración total de Zn+2 varió de 0,76 a 1,7 μM , la concentración de Fe+3 varió de 0,90 a 5,4 μM , la concentración de EDTA varió de 5,9 a 26,8 μM , y [EDTA-Fe+3] varió desde 0,53 a 23,6 μM .

- 5 En el análisis de los resultados experimentales DOE3, el impacto de Zn+2 fue dominante sobre los impactos de [EDTA] extracelular y [EDTA-Fe+3]. Por lo tanto, es razonable en la siguiente presentación de resultados agrupar los resultados experimentales del DOE3 como una función del [Zn+2] en cada biorreactor; se eligieron seis biorreactores como objetivo para [Zn+2] de 0,76 μM y se eligieron seis biorreactores para [Zn+2] de 1,7 μM .
- 10 La figura 8A es un gráfico de la eliminación de CTL (expresado como el porcentaje de des-Lys y calculado usando el procedimiento cIEF de datos del Pico 1) como una función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de concentraciones variables de EDTA sobre la eliminación de CTL en presencia de Zn⁺² 0,76 μM (la concentración inicial de Zn⁺² en el biorreactor correspondiente a la etiqueta "Fe:5 Zn:1 EDTA: 10" fue 6,3 μM , en lugar de 0,76 μM ; la concentración objetivo de Zn⁺² 0,76 μM se implementó desde el día 13 hasta el final del experimento). La figura
- 15 8B es un gráfico de la eliminación de CTL (expresado como el porcentaje de des-Lys y calculado usando el procedimiento cIEF de datos del Pico 1) como una función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de concentraciones variables de EDTA sobre la eliminación de CTL en presencia de Zn⁺² 1,7 μM . Como en el experimento SFM-10.1, los biorreactores del experimento DOE3 exhibieron una fuerte relación entre el porcentaje de eliminación de CTL y la concentración de Zn+2.
- 20 Los biorreactores con Zn+2 0,76 μM mostraron un porcentaje de eliminación de CTL significativamente más bajo que los biorreactores con Zn+2 1,7 μM . Los biorreactores con la concentración más alta de Zn+2 mostraron del 60 al 75 % de eliminación de CTL en los períodos de cultivo temprano, medio y tardío. Los biorreactores con una menor concentración de Zn+2 exhibieron un 40 % de eliminación de CTL los días 10-20 y la eliminación de CTL aumentó
- 25 gradualmente en función del día de cultivo, acercándose al 60 % de eliminación de CTL al final de los cultivos. Estos resultados son consistentes con el efecto de la concentración de Zn+2 observada en el experimento SFM-10.1.
- Como se ha indicado anteriormente, el biorreactor etiquetado "Fe:5, Zn:1, EDTA:10" experimentó una concentración de Zn+2 muy alta de 6,3 μM antes del día 13, que se correlaciona al 80 % de eliminación de CTL en los estados
- 30 tempranos del cultivo, la eliminación de CTL más alta alcanzada en este estudio. El porcentaje de eliminación de CTL en este biorreactor descendió gradualmente tras la corrección de su concentración en el medio de Zn+2 0,76 μM el día 13. Con una tasa de perfusión de aproximadamente 0,7 volúmenes de cultivo al día, la concentración de Zn+2 en el biorreactor de producción habría descendido a 0,76 μM en 10 días o menos. Sin embargo, el porcentaje de eliminación de CTL se mantuvo mucho más alto en este biorreactor que en sus biorreactores hermanos a 0,76
- 35 μM de Zn+2. Es decir, las células parecen tener un mecanismo que "recuerda" la exposición anterior a Zn+2.
- Aunque no desea estar sujeto a ninguna teoría en particular, se hipotetiza que esta "memoria" celular se relaciona con la acumulación de Zn+2 dentro de las células. Este Zn+2 acumulado no puede invertirse mediante una
- 40 reducción repentina en la concentración extracelular de Zn+2. Es probable que el Zn+2 acumulado por célula solo pueda reducirse mediante la división celular posterior, en la cual el Zn+2 acumulado se divide entre las células hijas. En las condiciones del experimento DOE3, el alcance de la división celular se limitó después de que las células alcanzaran la densidad de células diana aproximadamente el día 15-20.

La eliminación de CTL los días 10 y 13 para el biorreactor "Fe:5, Zn:1, EDTA:10" es aproximadamente un 80 % más alta que para los biorreactores a 1,7 μM de Zn^{+2} . Esto sugiere que, en las condiciones experimentales del experimento DOE3, Zn^{+2} 1,7 μM no es suficiente para saturar la necesidad de Zn^{+2} de las células.

5 Como se ha indicado anteriormente, los resultados del experimento DOE3 se correlacionaron fuertemente con la concentración de Zn^{+2} . Sin embargo, dentro de los resultados en una concentración dada de Zn^{+2} , hay evidencia de un efecto de EDTA (o EDTA-Fe+3) en la eliminación de CTL. Entre los biorreactores con de Zn^{+2} 0,7 μM , los dos biorreactores con la menor eliminación de CTL los días 13, 20 y 28 tuvieron los [EDTA] y [EDTA-Fe+3] más altos (biorreactores "Fe:1 Zn:1 EDTA:25" y "Fe:5 Zn:1 EDTA:28") (FIG. 8A). Por el contrario, el biorreactor con [EDTA] y [EDTA – Fe+3] más baja tenían la eliminación de CTL más alta ("Fe:1 Zn:1 EDTA:6").

Del mismo modo, entre los biorreactores con Zn^{+2} 1,7 μM , el biorreactor con la menor eliminación de CTL los días 13, 20 y 28 tuvo el la [EDTA] y [EDTA-Fe+3] más altas ("Fe:3 Zn:2 EDTA:27") (FIG. 8B).

15 Las figuras 9A y 9B muestran que hay una diferencia significativa en el contenido de ácido siálico en función de [Zn+2] en el experimento DOE3. Los días 10-20 hay un contenido de ácido siálico significativamente más alto en los biorreactores con Zn^{+2} 1,7 μM (FIG. 9B) que en los biorreactores a 0,76 μM (FIG. 9A). Para las muestras de biorreactores "tardíos", la diferencia en el contenido de ácido siálico se reduce, pero es aún mayor a 1,7 μM de Zn^{+2} que a 0,76 μM de Zn^{+2} .

Las figuras 9A y 9B son también evidencia de la "memoria de Zn^{+2} " celular tratada anteriormente. En el biorreactor, el contenido de ácido siálico era muy alto en el punto de tiempo más temprano para este biorreactor y permaneció mucho más alto que sus biorreactores hermanos que tenían Zn^{+2} 0,76 μM durante el período de cultivo , a pesar del hecho de que las concentraciones extracelulares de Zn^{+2} en todos los biorreactores habrían sido las mismas aproximadamente el día 20.

El contenido de ácido siálico los días 10 y 13 para el biorreactor "Fe:5, Zn:1, EDTA: 10" es aproximadamente un 18 %, significativamente mayor que para los biorreactores que tienen Zn^{+2} 1,7 μM . Esto sugiere que, en las condiciones experimentales del experimento DOE3, Zn^{+2} 1,7 μM no es suficiente para saturar la necesidad de Zn^{+2} por las células para soportar la adición de ácido siálico.

Como se ha indicado anteriormente, los resultados del experimento DOE3 se correlacionaron fuertemente con la concentración de Zn^{+2} . Sin embargo, dentro de los resultados a una concentración dada de Zn^{+2} , hay evidencia de un efecto de EDTA (o EDTA-Fe+3) sobre la eliminación de CTL. La figura 9A muestra que entre los biorreactores con Zn^{+2} 0,7 μM , el contenido de ácido siálico el día 38 aumenta a medida que disminuye [EDTA]. La figura 9B muestra que en los días 20 y 38, el contenido de ácido siálico aumenta a medida que disminuye [EDTA].

En el experimento DOE3, los cinco biorreactores con Zn^{+2} 0,76 μM tuvieron una tasa de crecimiento celular mucho menor durante los primeros 20 días (antes de alcanzar la densidad de células diana) que los seis biorreactores que tenían Zn^{+2} 1,7 μM (FIG. 10). Como se ha indicado anteriormente, el biorreactor etiquetado "Fe:5, Zn:1, EDTA:10" experimentó una concentración de Zn^{+2} muy alta de 6,3 μM antes del Día 13. Este biorreactor exhibió un comportamiento de crecimiento celular en el período anterior al Día 20 que coincidía con los biorreactores con 1,7 μM de Zn^{+2} . Estos datos sugieren que una concentración extracelular de Zn^{+2} de 1,7 μM es suficiente para saturar las necesidades intracelulares de Zn^{+2} de las células para la división celular.

Las figuras 11A y 11B muestran que la viabilidad del cultivo de los cinco biorreactores con Zn^{+2} 0,76 μM fue menor durante los primeros 30 días que la viabilidad del cultivo de los seis biorreactores con Zn^{+2} 1,7 μM . Cabe destacar que el biorreactor etiquetado "Fe:5, Zn:1, EDTA:10" exhibió una elevada viabilidad del cultivo el día 10 y 13, pero, a continuación, se invirtió para coincidir con su biorreactor hermano con una concentración de Zn^{+2} de 0,76 μM poco después de corregir la concentración de Zn^{+2} . Esto respalda la hipótesis de que la viabilidad del cultivo está relacionada con la concentración instantánea de Zn^{+2} extracelular, no con las reservas de Zn^{+2} dentro de la célula.

Las figuras 12A y 12B muestran que la concentración de anticuerpos de los cinco biorreactores con Zn^{+2} 0,76 μM fue menor durante los primeros 20 días que la de los seis biorreactores con Zn^{+2} 1,7 μM . El biorreactor etiquetado "Fe:5, Zn:1, EDTA:10" exhibió una concentración de anticuerpos comparable a la de los biorreactores a Zn^{+2} 1,7 μM , lo que respalda la hipótesis de que la producción de anticuerpos está relacionada con el Zn^{+2} acumulado en lugar del valor instantáneo de Zn^{+2} extracelular.

Las figuras 10, 11A, 11B, 12A y 12B muestran que no hay una correlación clara entre [EDTA] y la densidad de células viables, la viabilidad del cultivo y la concentración de anticuerpos en los resultados de DOE3.

El experimento DOE3 incluyó un intervalo de [Zn+2], [EDTA] y [EDTA – Fe+3]. Por ejemplo, [EDTA – Fe+3] varió de 0,5 a 23 μM . Sin embargo, el factor dominante en el resultado de estos experimentos fue la concentración extracelular de Zn^{+2} , que varía de 0,76 μM a 1,7 μM (e inicialmente 6,3 μM en el biorreactor "Fe:5, Zn:1, EDTA:10"). Los biorreactores con Zn^{+2} extracelular de 1,7 μM tenían una eliminación de CTL significativamente mayor,

contenido de ácido siálico, crecimiento celular inicial, viabilidad cultural inicial y producción inicial de anticuerpos que los biorreactores con Zn⁺² extracelular de 0,76 µM (FIGS. 8A, 8B, 9A, 9B, 10, 11A, 11B, 12A y 12B).

5 Dentro de los biorreactores a una determinada concentración de Zn⁺², hubo alguna evidencia de un impacto secundario de [EDTA] (o [EDTA-Fe⁺³]) sobre la eliminación de CTL y la adición de ácido siálico (FIGS. 8A, 8B, 9A y 9B). Los resultados no proporcionaron evidencia de un impacto de [EDTA] sobre el crecimiento celular, la viabilidad del cultivo y la producción de anticuerpos (FIGS. 10, 11A, 11B, 12A y 12B). El impacto de [EDTA] se exploró con más detalle en los experimentos de mezcla de BSA n.º 1 y n.º 2, que se analizarán en la siguiente sección.

10 El biorreactor "Fe: 5, Zn: 1, EDTA: 10" experimentó una concentración muy alta de Zn⁺² de 6,3 µM antes del Día 13, luego se devolvió a la concentración objetivo de Z⁺² de 0,76 µM. Este biorreactor exhibió un crecimiento celular inicial (FIG. 10), viabilidad del cultivo (FIGS. 11A y 11B) y productividad del anticuerpo (FIGS. 12A y 12B) comparables a las de los biorreactores con Zn⁺² 1,7 nM. Sin embargo, este biorreactor exhibió una mayor eliminación inicial de CTL y contenido de ácido siálico que los biorreactores a Zn⁺² a 1,7 µM. Este biorreactor exhibió una "memoria" para la alta concentración inicial de Zn⁺² que se extendió mucho más allá de la corrección de la concentración de Zn⁺² extracelular para la eliminación de CTL, el contenido de ácido siálico, la densidad celular y la producción de anticuerpos (FIGS. 8A, 8B, 9A, 9B, 10, 12A y 12B). Sin embargo, este biorreactor no exhibió una memoria para la viabilidad del cultivo; es decir, la viabilidad del cultivo se corrigió sin demora a medida que la concentración de Zn⁺² extracelular disminuyó de 6,3 µM a 0,76 µM (FIGS. 11A y 11B).

15 Las figuras 9C y D son gráficos del porcentaje de G0F (componente 1 de WAX1) como una función de la edad del biorreactor y muestra el efecto de concentraciones variables de EDTA sobre el porcentaje de especies no galactosiladas en presencia de Zn⁺² 0,76 µM y Zn⁺² 1,7 µM.

25 Los resultados del experimento DOE3 son consistentes con las hipótesis expresadas previamente para el experimento SFM-10.1. También emergen hipótesis adicionales:

- la eliminación de CTL, la adición de ácido siálico, el crecimiento celular y la expresión de anticuerpos se relacionan con la cantidad acumulada de Zn⁺² intracelular, en lugar de con la concentración extracelular actual de Zn⁺². Las reservas acumuladas de Zn⁺² se basan en la historia pasada de Zn⁺² extracelular, no en la concentración extracelular inmediata. Esta es la base de una "memoria celular" en relación con la ZN⁺² extracelular pasada.
- La viabilidad del cultivo está relacionada con la concentración extracelular actual de Zn⁺².

35 En las condiciones de este experimento, una concentración extracelular de 1,7 µM de Zn⁺² fue suficiente para saturar la necesidad de Zn⁺² de las células para soportar actividades enzimáticas relacionadas con el crecimiento celular y la expresión de anticuerpos. Sin embargo, 1,7 µM de Zn⁺² no fue suficiente para saturar la necesidad de Zn⁺² de las células para soportar la eliminación de CTL o la adición de ácido siálico. Estas hipótesis están respaldadas por los resultados para el biorreactor "Fe:5, Zn:1, EDTA:10," que tenía una concentración de 6,3 µM antes del día 13.

Ejemplo 6. Experimentos de la mezcla de BSA n.º 1 y n.º 2

45 Estos dos experimentos emplearon medio SFM-10. En cada experimento, se emplearon los mismos lotes de PRIMATONE® e insulina, asegurando concentraciones constantes de Zn⁺² y Fe⁺³. En los experimentos de mezcla de BSA n.º 1 y n.º 2, las concentraciones de Zn⁺² fueron 1,1 y 1,2 µM, respectivamente.

50 En cada experimento, se identificaron lotes de BSA que contenían concentraciones altas y bajas de EDTA, luego se mezclaron para crear un intervalo de concentraciones de EDTA en los biorreactores. El experimento de mezcla BSA n.º 1 empleó ocho biorreactores, con biorreactores de duplicación a cuatro concentraciones de EDTA. Los biorreactores duplicados en el experimento de mezcla de BSA n.º 1 están etiquetados como "A" y "B". El experimento de mezcla de BSA n.º 2 empleó ocho biorreactores, cada uno con una concentración diferente de EDTA. Las tablas 3 y 4 enumeran las concentraciones de Zn⁺², Fe⁺³, EDTA y EDTA-Fe en los biorreactores en los experimentos de mezcla de BSA n.º 1 y n.º 2.

55

Tabla 3. Concentraciones de Zn⁺², Fe⁺³, EDTA y [EDTA-Fe⁺³] en los ocho biorreactores del Experimento de mezcla de BSA n.º 1 (las concentraciones están en µM).

Brazo de biorreactor ^a	[Zn ⁺²]	[Fe ⁺³]	[EDTA]	[EDTA – Fe]
"EDTA: 6(A)"	1,2	3,1	5,9	2,8
"EDTA: 6(B)"	1,2	3,1	5,9	2,8
"EDTA: 11(A)"	1,2	3,1	10,8	7,7
"EDTA: 11(B)"	1,2	3,1	10,8	7,7

"EDTA: 13(A)"	1,2	3,1	13,2	10,1
"EDTA: 13(B)"	1,2	3,1	13,2	10,1
"EDTA: 16(A)"	1,2	3,1	15,7	12,5
"EDTA: 16(B)"	1,2	3,1	15,7	12,5
Los brazos del biorreactor se designan por la concentración aproximada de EDTA (en μM).				

Tabla 4. Concentraciones de Zn^{+2} , Fe^{+3} , EDTA y [EDTA- Fe^{+3}] en los ocho biorreactores del Experimento de mezcla de BSA n.º 2 (las concentraciones están en μM).

Brazo de biorreactor ^a	[Zn^{+2}]	[Fe^{+3}]	[EDTA]	[EDTA – Fe]
"EDTA: 2,7"	1,1	4,5	2,7	-1,8
"EDTA: 4,5"	1,1	4,5	4,5	0,0
"EDTA: 4,9"	1,1	4,5	4,9	0,5
"EDTA: 14,6"	1,1	4,5	14,6	10,1
"EDTA: 15,5"	1,1	4,5	15,5	11,0
"EDTA: 15,7"	1,1	4,5	15,7	11,2
"EDTA: 19,2"	1,1	4,5	19,2	14,7
"EDTA: 26,5"	1,1	4,5	26,5	22,0
^a Los brazos del biorreactor se designan por la concentración aproximada de EDTA (en μM).				

- 5 En ambos experimentos de mezcla de BSA, los biorreactores con concentraciones más altas de EDTA experimentaron menos eliminación de CTL, y viceversa: los biorreactores con concentraciones más bajas de EDTA experimentaron una mayor eliminación de CTL. El efecto fue más evidente el día 35 en cada experimento, luego disminuyó los días de cultivo posteriores (FIGS. 13A y 14A).
- 10 En ambos experimentos de mezcla de BSA, los biorreactores con concentraciones más altas de EDTA experimentaron un menor contenido de ácido siálico y viceversa: los biorreactores con concentraciones más bajas de EDTA experimentaron un mayor contenido de ácido siálico. El efecto se mantuvo para las muestras de biorreactores tempranos, medios y tardíos (FIGS. 13B y 14B).
- 15 En ambos experimentos de mezcla de BSA, los biorreactores con mayores concentraciones de EDTA menores concentraciones de EDTA exhibieron un crecimiento celular comparable (FIGS. 13C y 14C) y una viabilidad de cultivo comparable (FIGS. 13D y 14D).
- 20 Se observó un efecto menor de la concentración de EDTA sobre la producción de anticuerpos en los experimentos de mezcla de BSA. En el experimento de mezcla de BSA n.º 1, los biorreactores con EDTA alto y bajo tienen una producción de anticuerpos comparable antes de alcanzar la densidad celular objetivo. Durante el período justo después de alcanzar la densidad celular objetivo (desde aproximadamente el día 5 hasta el día 25), los biorreactores con EDTA más alto tienen una expresión de anticuerpo menor que los biorreactores con EDTA bajo (FIGS. 13E y 13F). En el experimento de mezcla de BSA N.º 2, se observó una reducción de la producción de anticuerpos para las dos de [EDTA] más altas comenzando el día 10 y los biorreactores con la [EDTA] más baja mostraron una mayor producción de anticuerpos aproximadamente el día 15 (FIGS. 14E y 14F). Sin embargo, no se observó un efecto de [EDTA] sobre la producción de anticuerpos en el experimento DOE3 (FIG. 12B).
- 25 Para los biorreactores con Zn^{+2} extracelular de aproximadamente 1,1 a 1,2 μM , los experimentos de mezcla de BSA demostraron que la concentración de EDTA puede tener un impacto significativo sobre la eliminación de CTL y la adición de ácido siálico. Además, puede haber un impacto menor de la concentración de EDTA en la producción de anticuerpos durante el período comprendido entre el día 10 y el día 25, aunque este efecto no fue evidente en el experimento DOE3. A estas concentraciones de Zn^{+2} , el EDTA no tuvo un impacto discernible sobre el crecimiento celular o la viabilidad del cultivo.
- 30 Debido a que la concentración de Fe^{+3} fue constante en los biorreactores de los experimentos de mezcla de BSA, las correlaciones señaladas anteriormente para [EDTA] son igualmente válidas para [EDTA- Fe^{+3}].
- 35 En ambos experimentos de mezcla de BSA, se demostró que la disminución de la concentración de EDTA conduce a una disminución en el porcentaje de oligosacáridos agalactosilados (FIGS. 13G y 15). Por lo tanto, la disminución de la concentración de EDTA conduce a un mayor contenido de galactosa y más ácido siálico.
- 40

Aunque sin desear estar sujetos a teoría alguna en particular, los datos de los experimentos de mezcla de BSA respaldan las siguientes hipótesis:

- EDTA (o [EDTA-Fe+3]) puede influir sobre la velocidad de absorción de Zn+2 por las células. Es probable que este efecto sea más evidente cuando la concentración extracelular de Zn+2 es baja, y las células experimentan deficiencia de Zn+2 intracelular en apoyo de las enzimas que tienen requerimientos de Zn+2.

- Las células tienen sistemas intracelulares elaborados para almacenar y distribuir Zn+2 y hay prioridades para la distribución de Zn+2 en períodos de limitación de Zn+2. En condiciones de limitación de Zn+2, las células colocarán una prioridad en los procedimientos intracelulares que requieren Zn+2 para la división celular. Por lo tanto, en los experimentos de mezcla de BSA n.º 1 y n.º 2, no hubo impacto de EDTA sobre el crecimiento celular porque las células tenían suficiente Zn+2 para la división celular en las condiciones de este estudio. Del mismo modo, la expresión del anticuerpo se vio mínimamente afectada por EDTA en las condiciones de este experimento. La distribución intracelular de Zn+2 para apoyar la eliminación de CTL y la adición de ácido siálico tienen una prioridad intracelular menor que la distribución de Zn+2 para el crecimiento celular. Por lo tanto, en las condiciones en las que EDTA no afecta al crecimiento celular, puede haber un impacto significativo de EDTA sobre la eliminación de CTL y la adición de ácido siálico.

- Los biorreactores de infliximab se manejan en los primeros 15 a 20 días de una manera que se asemeja al cultivo de alimentación discontinua. Es decir, las células se inoculan a una densidad celular inicial baja y se alimentan continuamente durante los próximos 15 a 20 días con medio nuevo para mantener el crecimiento celular y la expresión del anticuerpo. Por lo tanto, los resultados experimentales descritos en el presente documento se aplican por igual a los cultivos de alimentación discontinua y a los cultivos de perfusión.

Ejemplo 7 - Análisis adicional de DOE3 y mezcla de BSA n.º 1 y n.º 2

Experimentos

Los experimentos DOE3 y de mezcla de BSA se realizaron en el mismo laboratorio utilizando el mismo modelo de biorreactor de pequeña escala y las muestras se analizaron mediante el mismo grupo de ensayo. Por lo tanto, debería ser posible comparar los resultados de los experimentos DOE3 y de mezcla de BSA n.º 1 y n.º 2 entre sí.

En el experimento DOE3 y el experimento de mezcla de BSA n.º 1, las muestras se recogieron el día 20 y se analizaron mediante cIEF y el ensayo WAX. Las figuras 17, 19, 20 y 21 muestran los datos del día 20 del experimento DOE3 y el experimento de mezcla de BSA n.º 1 trazados conjuntamente. Los resultados mostrados en las figuras 17, 19 y 20 respaldan análisis previos, concretamente, que la eliminación de CTL aumenta al aumentar [Zn+2], el contenido de ácido siálico aumenta al aumentar [Zn+2] y el porcentaje de oligosacáridos de agalactosilo disminuye al aumentar [Zn+2]. Estos últimos dos resultados son consistentes con la promoción de las reacciones enzimáticas para la adición de galactosa y la adición de ácido siálico, como se muestra en la figura 16.

La figura 21 muestra que la relación entre ácido siálico y galactosa aumenta al aumentar [Zn+2].

La figura 26 es un gráfico del porcentaje de ácido siálico (componente 5 de WAX) como una función del porcentaje de G0F (el componente dominante de agalactosilo del componente 1 de WAX) y muestra la relación inversa entre el porcentaje de oligosacáridos de agalactosilo para los experimentos DOE3 y de mezcla de BSA n.º 1 y n.º 2. La figura 26 muestra que la adición de galactosa y la adición de ácido siálico tienden a acoplarse en los experimentos DOE3 y de mezcla de BSA n.º 1 y n.º 2, consistentes con un acoplamiento de las reacciones catalizadas por galactosiltransferasa y sialiltransferasa. En otras palabras, los factores que potencian estas dos reacciones de glicosilación dirigen más G0F hacia los oligosacáridos que contienen ácido siálico.

Los experimentos de mezcla de BSA n.º 1 y n.º 2 incluyeron ambos una muestra recogida los días 33-35. Las figuras 22-25 muestran los datos del día 33-35 de los experimentos de mezcla de BSA n.º 1 y n.º 2. Las figuras 22-25 muestran que a concentraciones más bajas de EDTA, hay mayor eliminación de CTL, mayor contenido de ácido siálico, menor porcentaje de oligosacáridos de agalactosilo y una relación más alta entre ácido siálico y galactosa.

Listado de secuencias

5 <110> JANSSEN BIOTECH, INC.
 JANSSEN BIOLOGICS, B.V.
 FLIKWEERT, Marcel
 GOOCHEE, Charles
 MASLANKA, Francis C.
 NAGEL, Franciscus Johannes Ignatius
 10 RYLAND, James R
 SCHAEFER, Eugene

<120> Procedimientos de fabricación para controlar la lisina C-terminal, la galactosa y el contenido de ácido siálico en proteínas recombinantes
 15 <130> JBI5029WOPCT

<140> Pendiente de asignación
 <141> Pendiente de asignación
 20 <150> 61/791¥094
 <151> 2013-03-15

<160> 30
 25 <170> FastSEQ para la versión 4.0 de Windows

<210> 1
 <211> 157
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

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

<210> 2
 <211> 321
 <212> ADN
 40 <213> Mus Balb/c

<220
 <221> CDS
 <222> 1/321
 45 <400> 2

ES 2 690 047 T3

gac atc ttg ctg act cag tct cca gcc atc ctg tct gtg agt cca gga 48
 Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa aga gtc agt ttc tcc tgc agg gcc agt cag ttc gtt ggc tca agc 96
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Val Gly Ser Ser
 20 25 30

atc cac tgg tat cag caa aga aca aat ggt tct cca agg ctt ctc ata 144
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

aag tat gct tct gag tct atg tct ggg atc cct tcc agg ttt agt ggc 192
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tca ggg aca gat ttt act ctt agc atc aac act gtg gag tct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Thr Val Glu Ser
 65 70 75 80

gaa gat att gca gat tat tac tgt caa caa agt cat agc tgg cca ttc 288
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Trp Pro Phe
 85 90 95

acg ttc ggc tcg ggg aca aat ttg gaa gta aaa 321
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Val Lys
 100 105

<210> 3
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Mus Balb/c

<400> 3

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Val Gly Ser Ser
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Thr Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Trp Pro Phe
 85 90 95
 10 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Val Lys
 100 105

<210> 4
 <211> 357
 <212> ADN
 15 <213> Mus Balb/c

<220
 <221> CDS
 <222> 1/357

20 <400> 4

ES 2 690 047 T3

gaa gtg aag ctt gag gag tct gga gga ggc ttg gtg caa cct gga gga 48
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc atg aaa ctc tcc tgt gtt gcc tct gga ttc att ttc agt aac cac 96
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn His
 20 25 30

tgg atg aac tgg gtc cgc cag tct cca gag aag ggg ctt gag tgg gtt 144
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gct gaa att aga tca aaa tct att aat tct gca aca cat tat gcg gag 192
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

tct gtg aaa ggg agg ttc acc atc tca aga gat gat tcc aaa agt gct 240
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ala
 65 70 75 80

gtc tac ctg caa atg acc gac tta aga act gaa gac act ggc gtt tat 288
 Val Tyr Leu Gln Met Thr Asp Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
 85 90 95

tac tgt tcc agg aat tac tac ggt agt acc tac gac tac tgg ggc caa 336
 Tyr Cys Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

ggc acc act ctc aca gtc tcc 357
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 115

<210> 5
 <211> 119
 5 <212> PRT
 <213> Mus Balb/c

<400> 5

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn His
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ala
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Thr Asp Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 115

<210> 6
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5

<210> 7
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5

5 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220
 <223> Oligonucleótidos de PCR

<400> 8

15 cctggatacc tgtgaaaaga 20

<210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220
 <223> Oligonucleótidos de PCR

25 <400> 9

cctggtacct tagtcaccgt ctctca 27

30 <210> 10
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220
 <223> Oligonucleótidos de PCR

<400> 10

40 aatagatata tcctcaaca cctgcaa 27

<210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220
 <223> Oligonucleótidos de PCR

50 <400> 11

atcgggacaa agttggaat a 21

<210> 12
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220
 <223> Oligonucleótidos de PCR

<400> 12

60 ggcggtctgg taccgg 16

65

<210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220
 <223> Oligonucleótidos de PCR

 10 <400> 13

 gtcaacaaca tagtcatca 19

 <210> 14
 15 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220
 20 <223> Oligonucleótidos de PCR

 <400> 14

 cacaggtgtg tccccaagga aaa 23
 25
 <210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220
 <223> Oligonucleótidos de PCR

 <400> 15
 35
 aatctggggt aggcacaa 18

 <210> 16
 <211> 17
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220
 <223> Oligonucleótidos de PCR
 45
 <400> 16

 agtgtgtgtc cccaagg 17
 50
 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220
 <223> Oligonucleótidos de PCR

 <400> 17

 60 cacagctgcc cgcccaggtg gcat 24

 <210> 18
 <211> 17
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220
 <223> Oligonucleótidos de PCR
 <400> 18
 5 gtcgccagtg ctcctt 17
 <210> 19
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220
 <223> Oligonucleótidos de PCR
 15 <400> 19
 atcggacgtg gacgtgcaga 20
 20 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220
 <223> Secuencia parcial de pH707
 <400> 20
 Ile Glu Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 30 1 5 10
 <210> 21
 <211> 46
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220
 <223> Secuencia parcial de pH707
 40 <400> 21
 cacaggtatc caggcctggt accttagtca cgtctctc aggtaa 46
 <210> 22
 45 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220
 50 <223> Secuencia parcial de pH707
 <400> 22
 cacaggtatc caggca 16
 55 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220
 <223> Secuencia parcial de pH707
 <400> 23
 65

ES 2 690 047 T3

Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5
 <210> 24
 <211> 32
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220
 <223> Secuencia parcial de pHC707
 10 <400> 24
 cctggtacct tagtcaccgt ctctcaggt aa 32
 15 <210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220
 <223> Secuencia parcial de pLC871
 <400> 25
 Val Glu Gly Asp Ile Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 25 1 5 10
 <210> 26
 <211> 52
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220
 <223> Secuencia parcial de pLC871
 35 <400> 26
 ttgcaggtg ttgaaggaga tatcgggaca aagttggaaa taaaacgtaa gt 52
 <210> 27
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220
 45 <223> Secuencia parcial de pLC671
 <400> 27
 Val Glu Gly Asp
 50 1
 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220
 <223> Secuencia parcial de pLC671
 <400> 28
 60 ttgcaggtg ttgaaggaga t 21
 <210> 29

<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220
<223> Secuencia parcial de pLC671

<400> 29

Ile Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

10 1 5

<210> 30
<211> 31
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220
<223> Secuencia parcial de pLC671

20 <400> 30

atcgggacaa agtggaaat aaaacgtaag t 31

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene un contenido de lisina C-terminal de 20 % a 70 %, y un contenido de ácido siálico de 1 % a 20 %, comprendiendo el procedimiento:
- 10 cultivar una célula huésped sensible al cinc transfectada con ADN que codifica el anticuerpo en un medio de cultivo que comprende cinc de 0,5 μM a 6,5 μM ; y controlar la concentración de cinc en el medio de cultivo, produciendo de ese modo el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que
- a) el contenido de lisina C-terminal del anticuerpo es del 40 % al 70 %, opcionalmente del 55 % al 65 %, y opcionalmente del 60 %; y/o
- b) el contenido de ácido siálico del anticuerpo es del 3 % al 14 %.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo anti-TNF α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo (i) inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal producido a partir del hibridoma depositado con el número de referencia en la ATCC PTA-7045 al TNF α humano; y (ii) se une a un epítipo neutralizante de TNF α humano con una afinidad de al menos 1×10^8 litro/mol, medido como una constante de asociación (K $_a$).
- 25 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo es:
- a) un anticuerpo humano;
- b) un anticuerpo humanizado o quimérico;
- 30 c) de la clase de inmunoglobulinas IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM, opcionalmente en las que el anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región constante de IgG1; o
- d) seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab') $_2$ y Fv.
- 35 5. El método según la reivindicación 3, caracterizado por que
- a) la cadena ligera comprende todas las regiones de unión a antígeno de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido a partir del hibridoma depositado con el número de referencia en la ATCC PTA-7045;
- b) la cadena pesada comprende todas las regiones de unión a antígeno de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producido a partir del hibridoma depositado con el número de referencia en la ATCC PTA-7045; o
- 40 c) la cadena ligera comprende todas las regiones de unión a antígeno de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido a partir del hibridoma depositado con el número de referencia en la ATCC PTA-7045 y la cadena pesada comprende todas las regiones de unión a antígeno de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producido a partir del hibridoma depositado con el número de referencia en la ATCC PTA-7045.
- 45 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable no humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 5, opcionalmente en el que la región variable no humana comprende un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4.
- 50 7. El procedimiento de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que el anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene especificidad epitópica idéntica a infliximab, opcionalmente en el que el anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo es infliximab.
- 55 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que:
- a) la concentración de cinc en el medio de cultivo está en el intervalo de 0,6 μM a 6,5 μM , opcionalmente en el que la concentración de cinc en el medio de cultivo está en el intervalo de 0,6 μM a 1,1 μM ; y/o
- 60 b) el medio de cultivo comprende además un intervalo de la concentración total de EDTA de 2,5 μM a 30 μM , y el procedimiento comprende además controlar la concentración de EDTA libre de hierro en el medio de cultivo, opcionalmente en el que el medio de cultivo comprende además EDTA libre en un intervalo de concentración de 5 μM a 16 μM .
- 65 9. El procedimiento de la reivindicación 8, que comprende además recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo se recupera cuando las células huésped sensibles al cinc en el medio de cultivo alcanzan una densidad celular de 1,5 millones de células por ml a 11 millones de células por ml, opcionalmente una densidad celular de 3 millones de células por ml a 11 millones de células por ml.

5 11. El procedimiento de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que la concentración de cinc se controla hasta que se recupera el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

10 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que:

- a) la concentración de cinc se controla durante una fase de crecimiento exponencial de las células huésped sensibles al cinc;
- b) el control de la concentración de cinc comprende monitorizar la concentración de cinc en el medio de cultivo y regular la concentración de cinc en el medio de cultivo, de modo que la concentración de cinc en el medio de cultivo sea de al menos 0,5 μM , opcionalmente en el intervalo de 0,6 μM a 6,5 μM ;
- 15 c) el anticuerpo tiene un contenido de galactosa de 50 % a 90 %, opcionalmente de 45 % a 85 %;
- d) el anticuerpo tiene una relación entre ácido siálico y galactosa de 0,05 a 0,20; y/o
- e) la célula huésped sensible al cinc es una célula SP2/0.

20 13. Un procedimiento para controlar:

- a) el contenido de lisina C-terminal de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene un contenido de lisina C-terminal de 20 % a 70 %;
- 25 b) el contenido de ácido siálico de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene un contenido de ácido siálico de 1 % a 20 %;
- c) el contenido de galactosa de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene un contenido de galactosa de 50 % a 90 %; y/o
- d) la relación entre ácido siálico y galactosa en un anticuerpo que tiene una relación entre ácido siálico galactosa de 0,05 a 0,20,

30 en un procedimiento para biosintetizar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en un medio de cultivo, comprendiendo el procedimiento:

- 35 controlar un nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo; y
- regular el nivel de cinc en el medio de cultivo durante la biosíntesis del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

40 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo, opcionalmente en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo (i) inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal producido a partir del hibridoma depositado con el número de referencia en la ATCC PTA-7045 al TNF α humano; y (ii) se une a un epítipo neutralizante de TNF α humano con una afinidad de al menos 1×10^8 litro/mol, medido como una constante de asociación (K_a).

45 50 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene especificidad epitópica idéntica a infliximab, opcionalmente en el que el anticuerpo es infliximab, tal como en el que el anticuerpo es biosintetizado por una línea celular SP2/0.

55

60

65

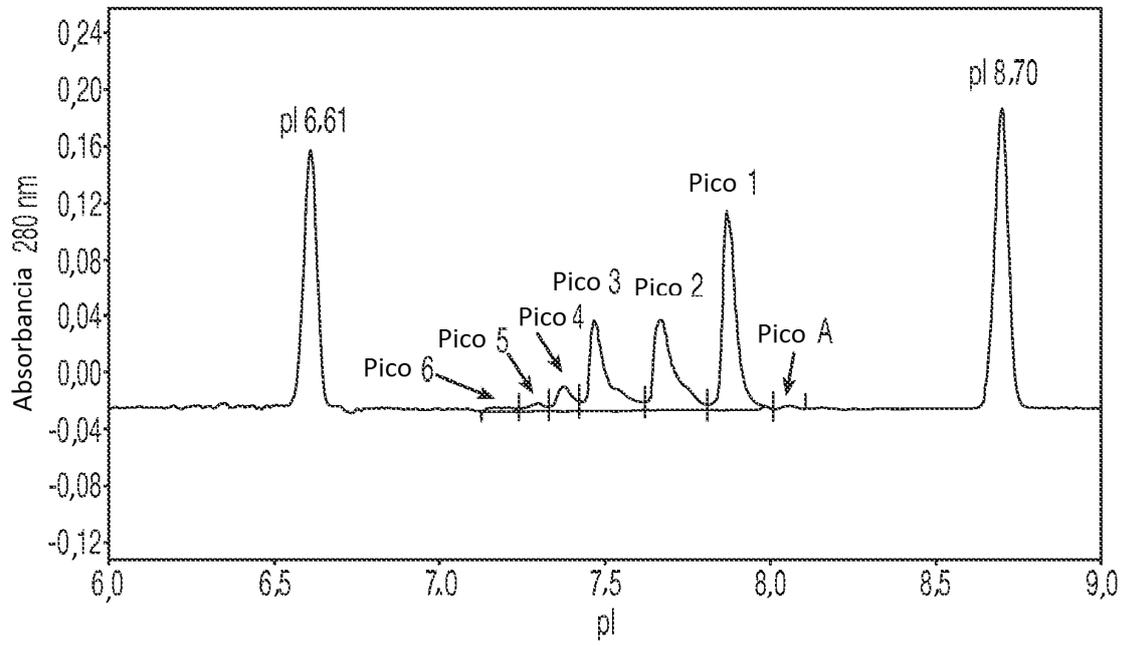


FIG. 1

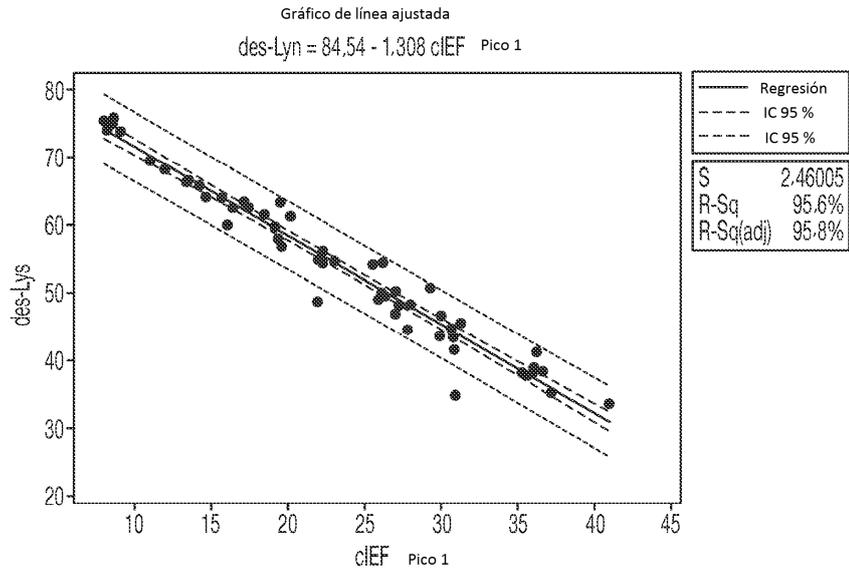


FIG. 2

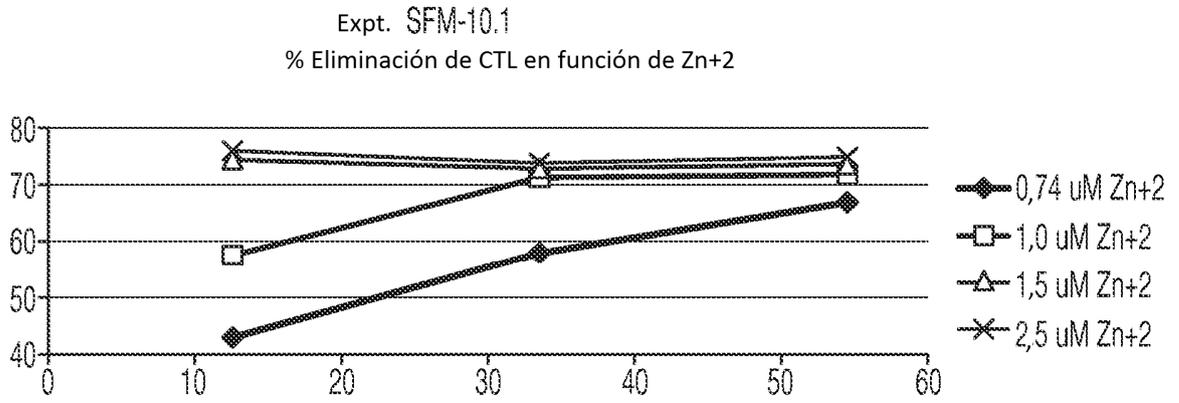


FIG. 3

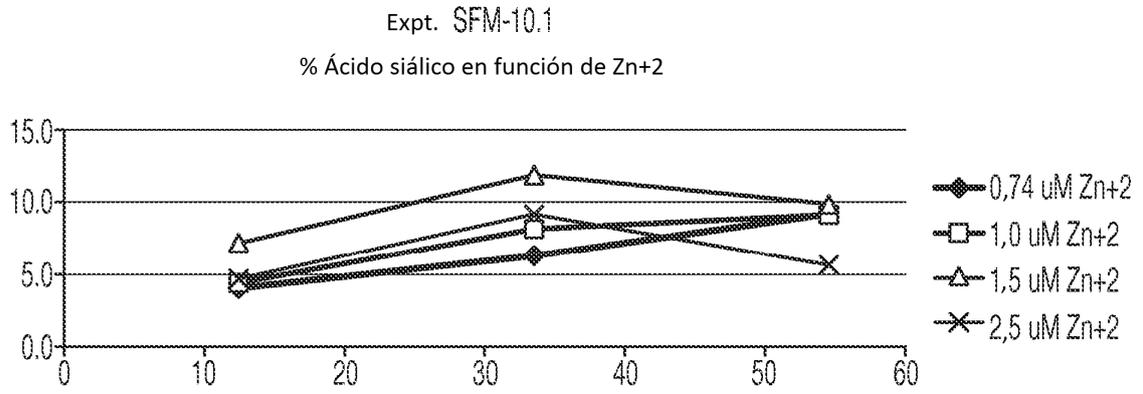


FIG. 4

Expt. SFM-10.1
Densidad de células viables en función de Zn²⁺

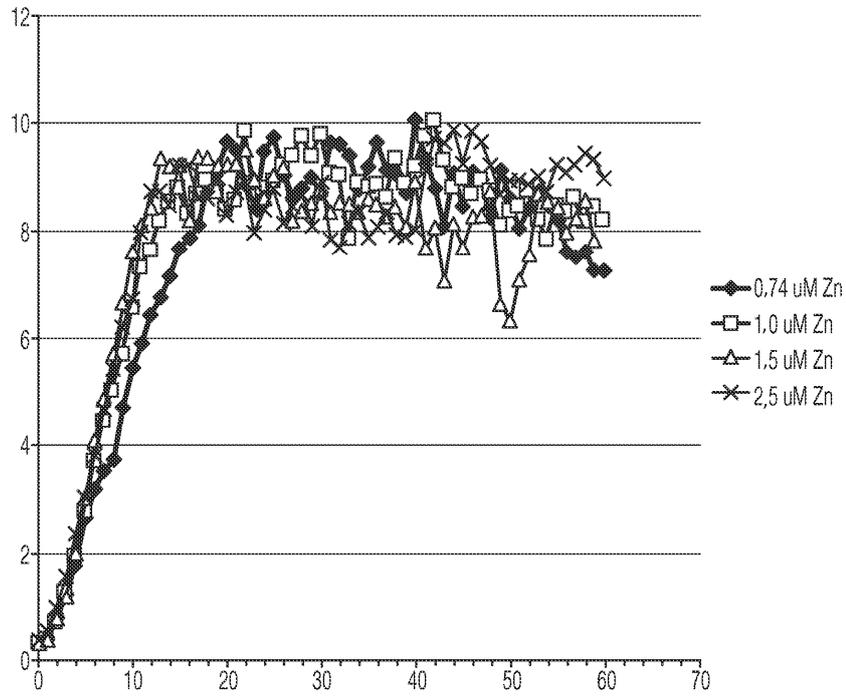


FIG. 5

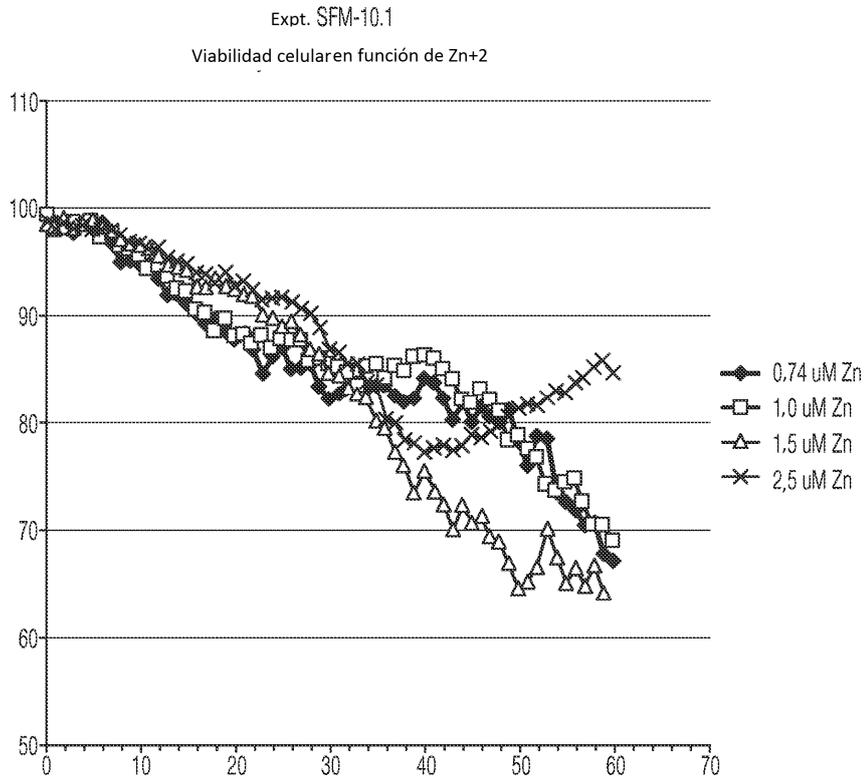


FIG. 6

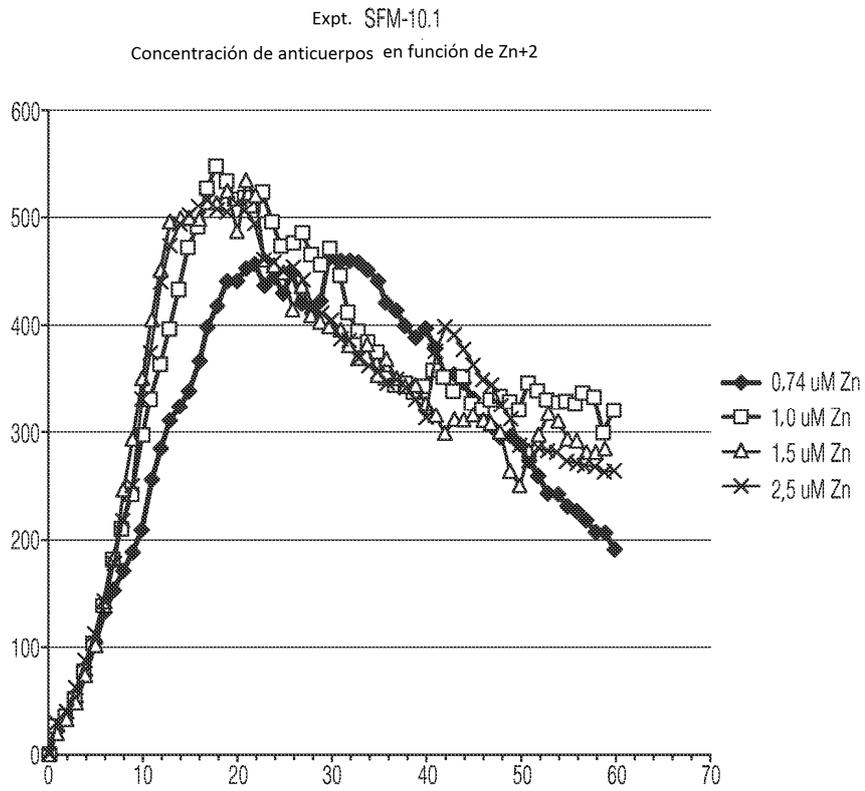


FIG. 7

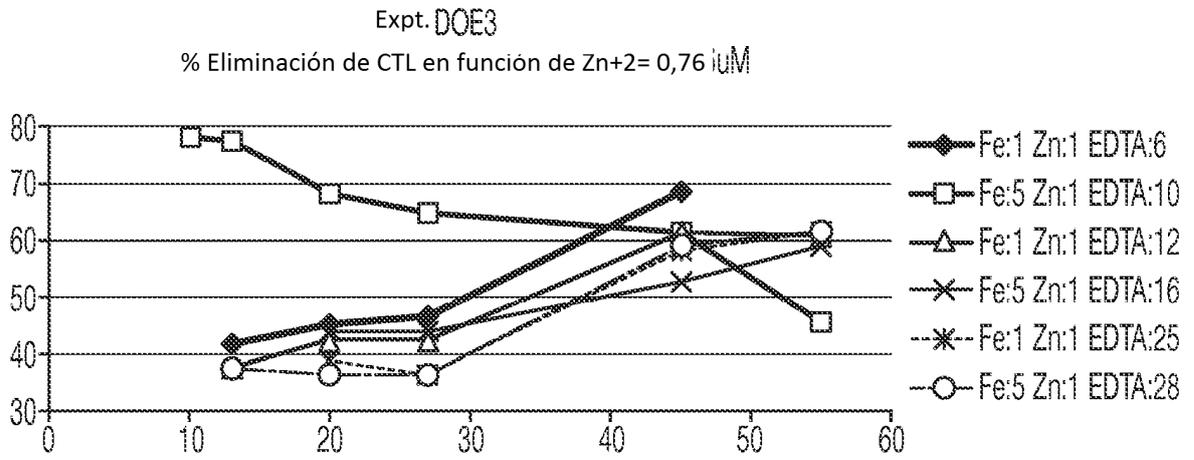


FIG. 8A

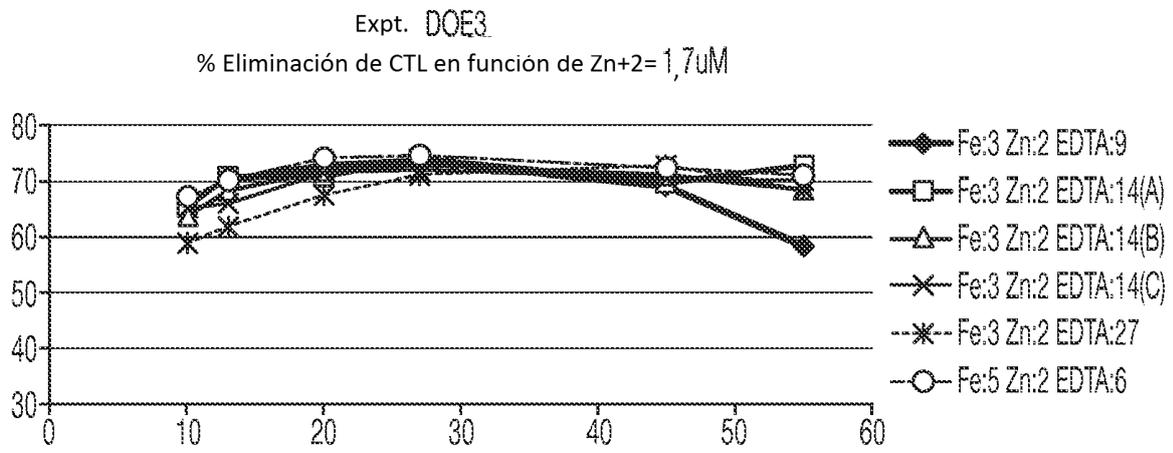


FIG. 8B

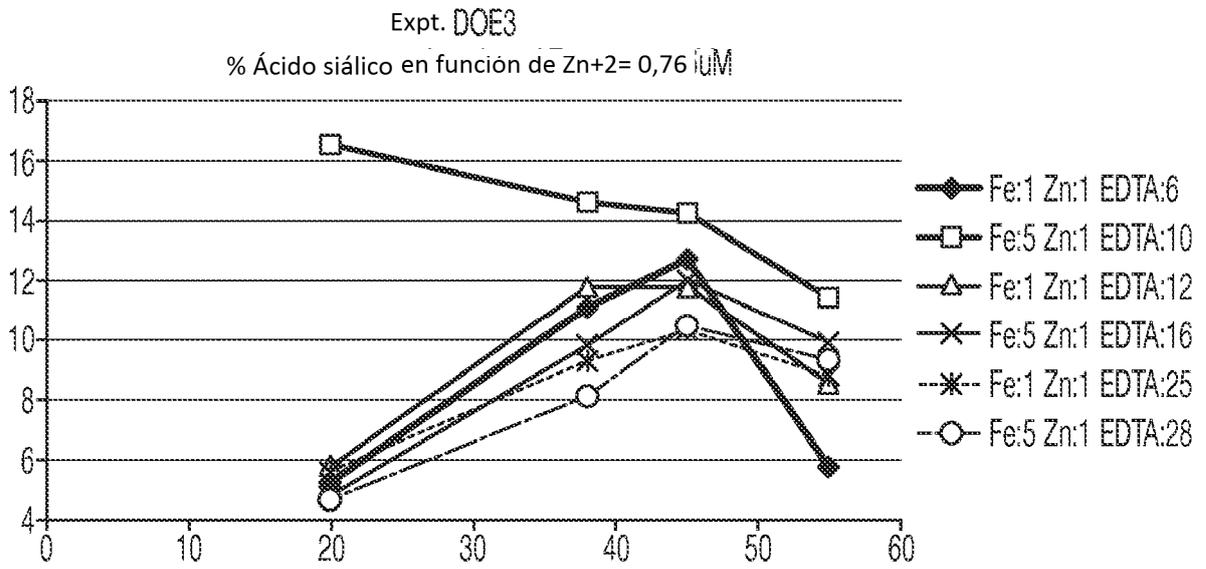


FIG. 9A

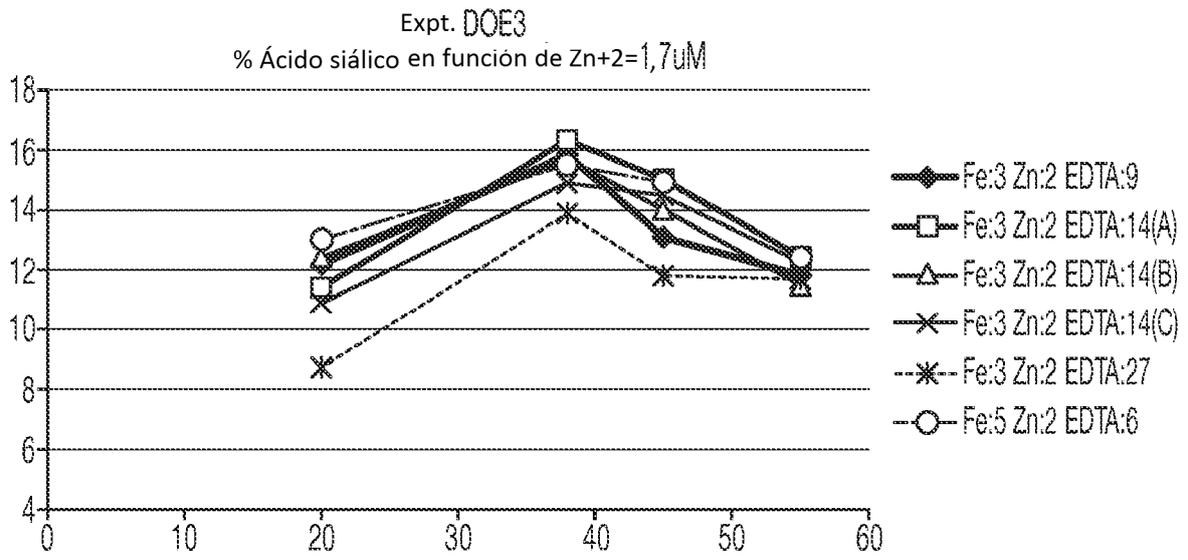


FIG. 9B

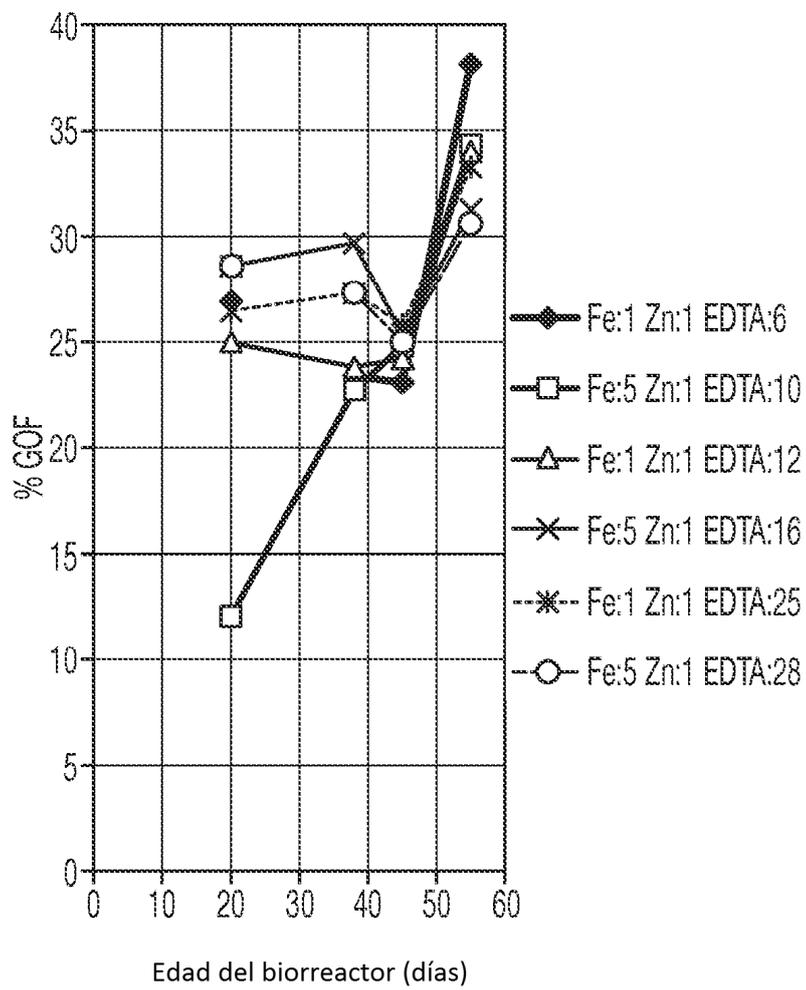


FIG. 9C

Edad del biorreactor (días)

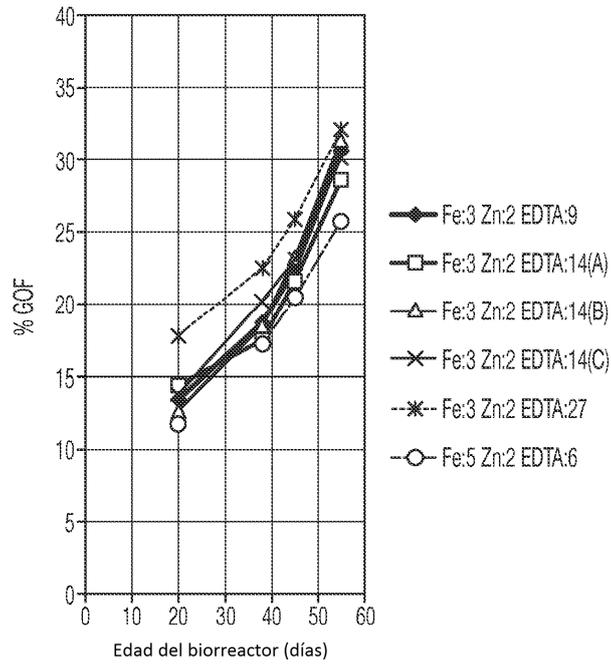
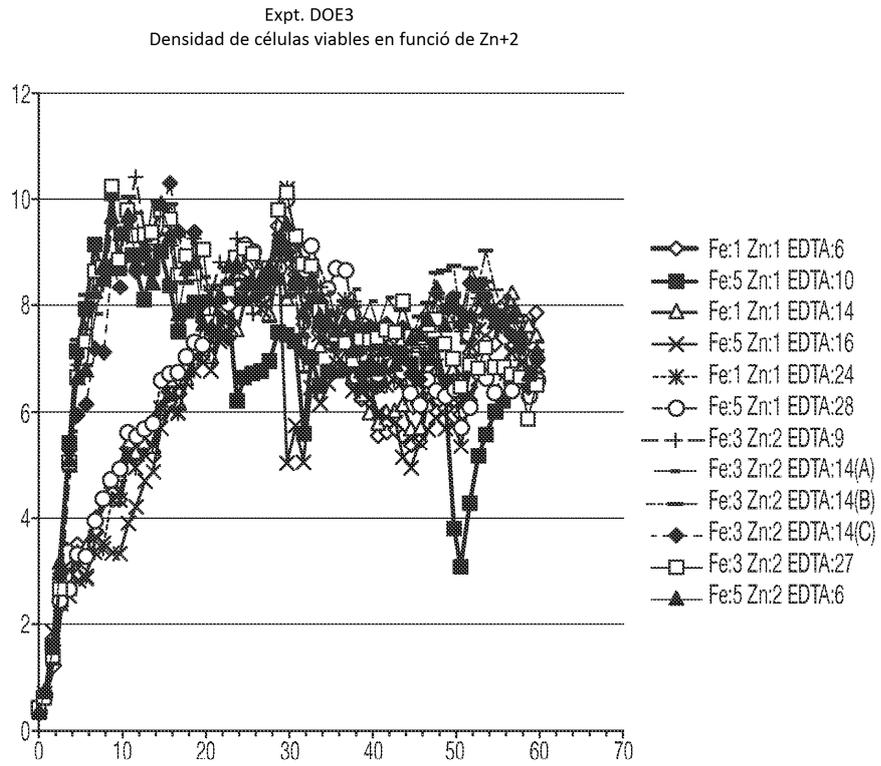


FIG. 9D



Expt. DOE3

Viabilidad del cultivo en función de Zn²⁺

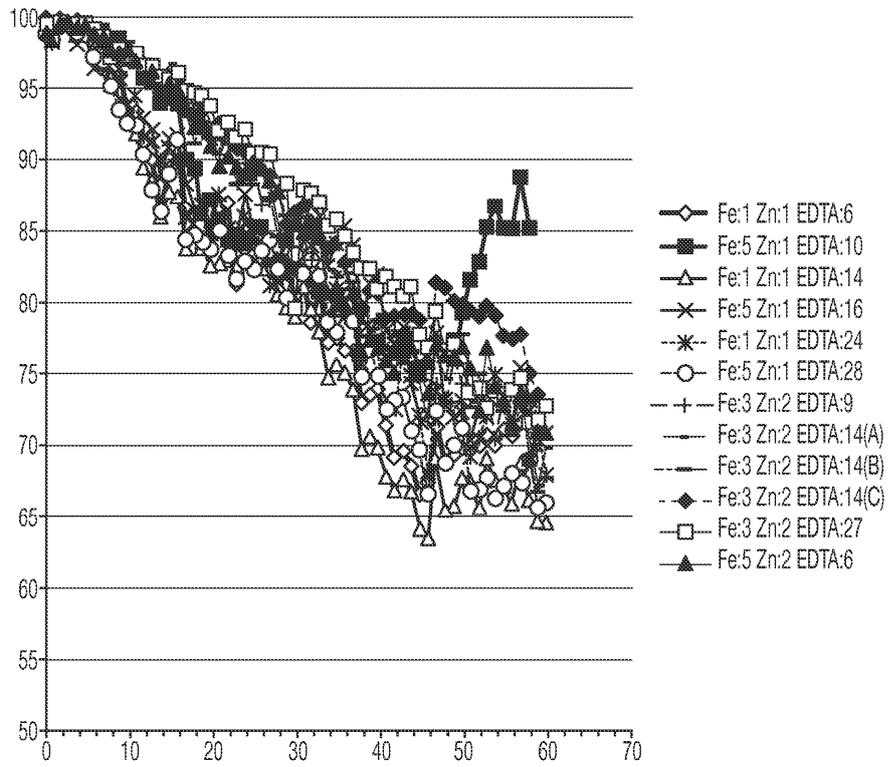


FIG. 11A

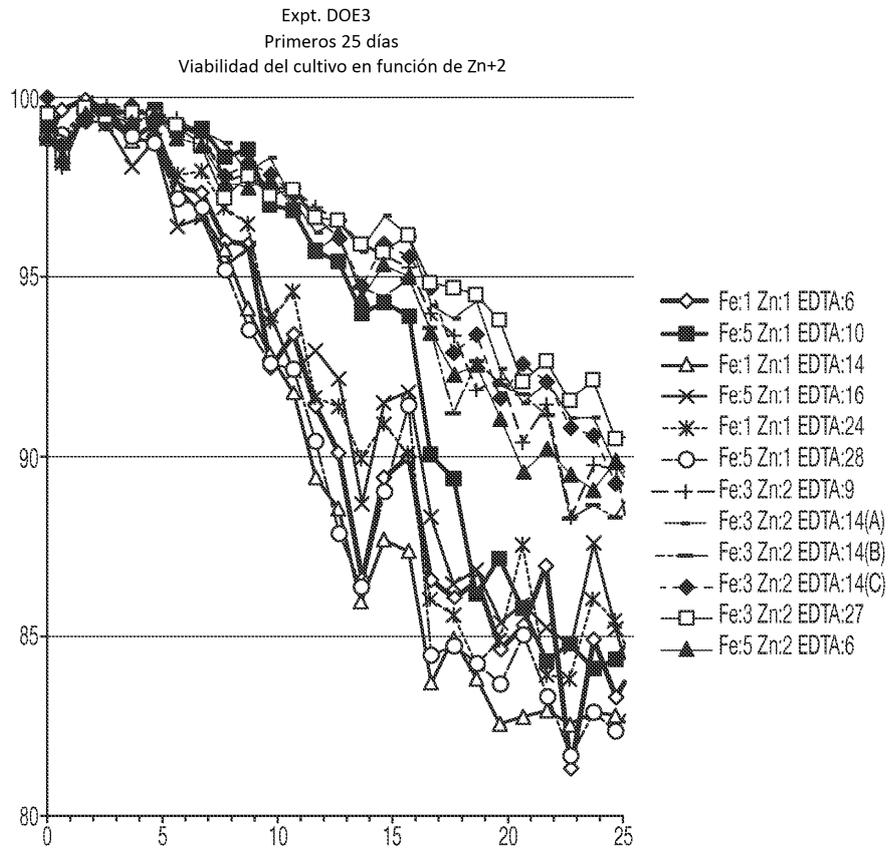


FIG. 11B

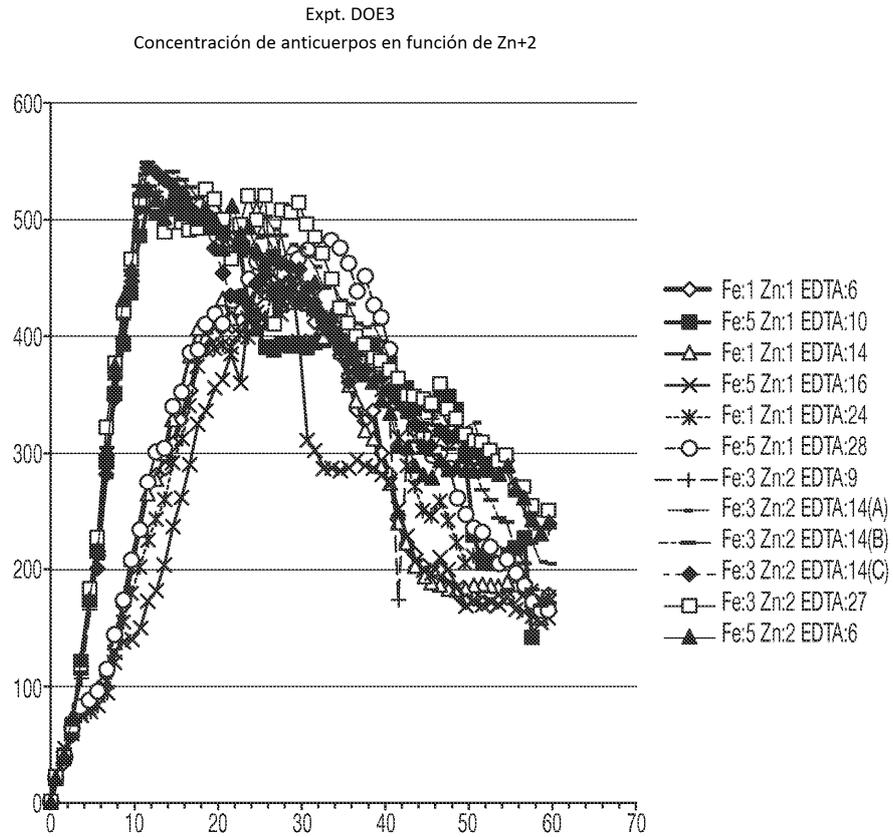


FIG. 12A

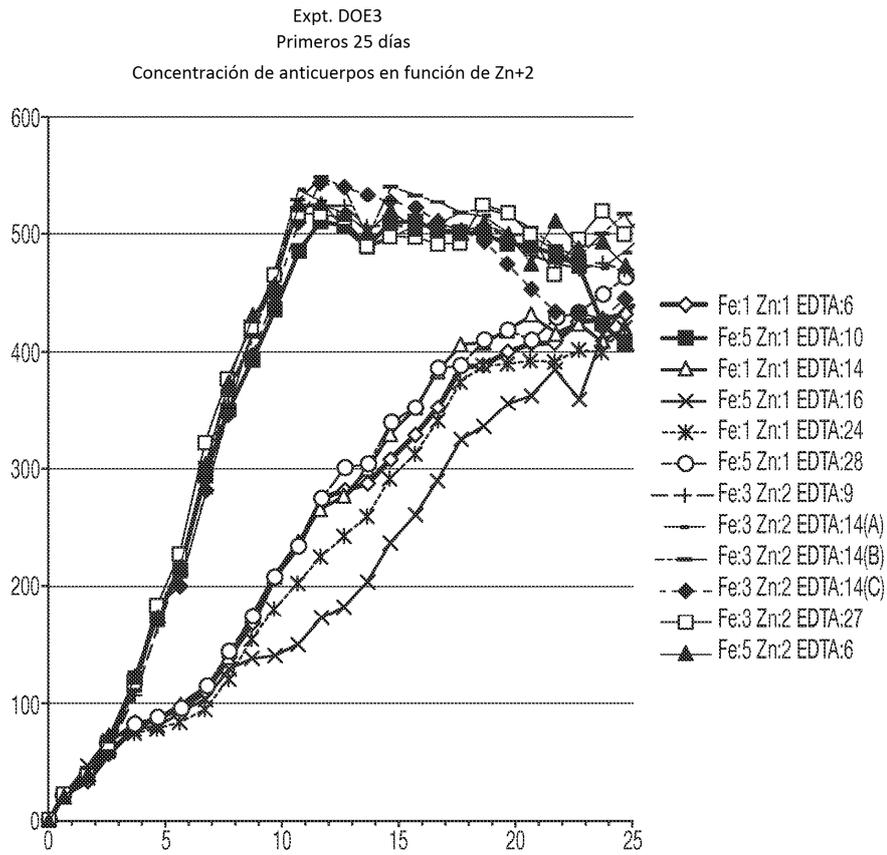


FIG. 12B

Expt. n.º 1 de mezcla de BSA
% Eliminación de CTL en función de EDTA usando
el promedio de biorreactores duplicados

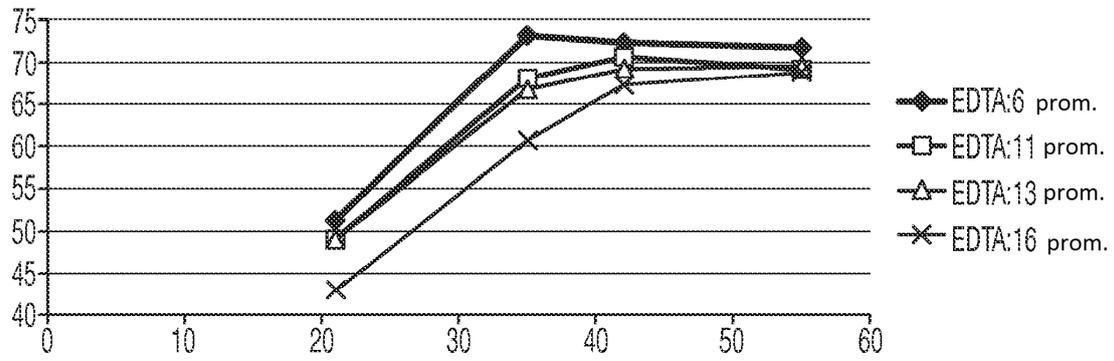


FIG. 13A

Expt. n.º 1 de mezcla de BSA
 % Ácido siálico en función de EDTA usando
 el promedio de biorreactores duplicados

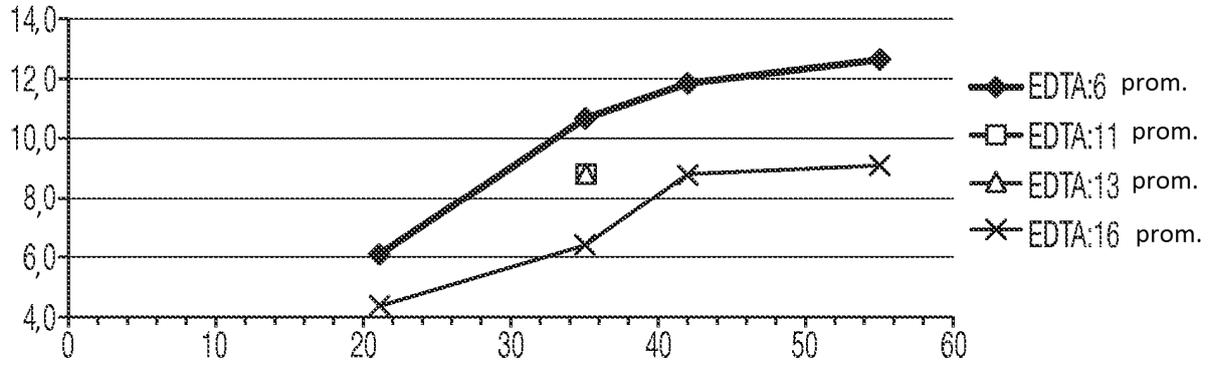


FIG. 13B

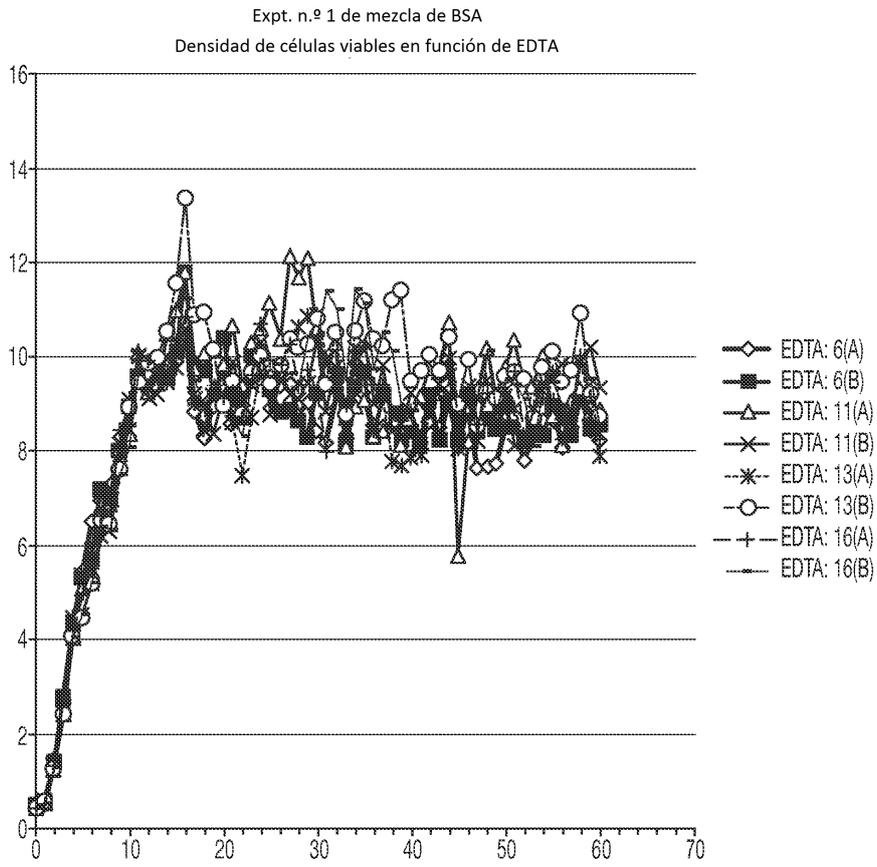


FIG. 13C

Expt. n.º 1 de mezcla de BSA

Viabilidad celular en función de EDTA

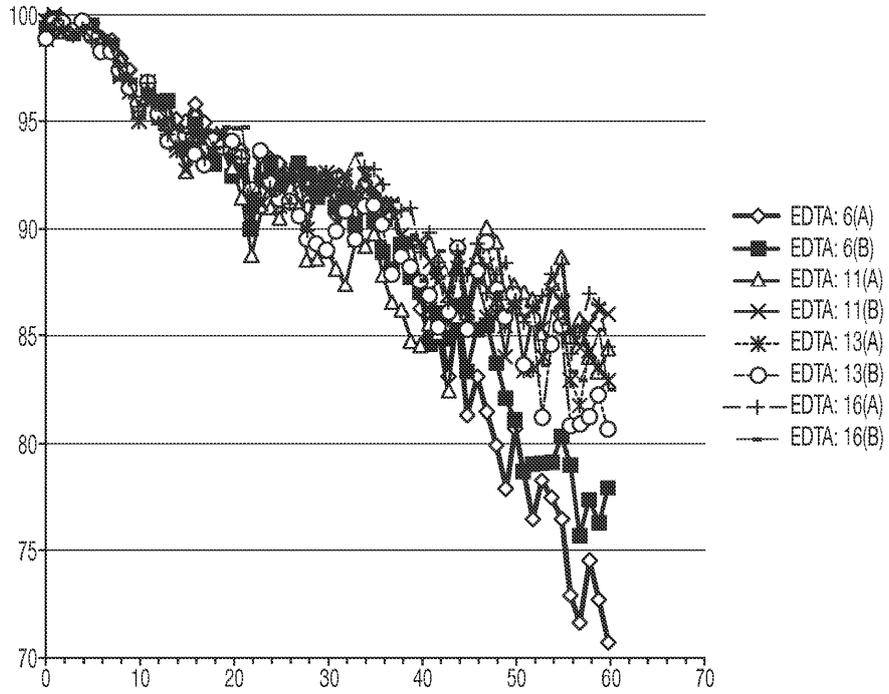


FIG. 13D

Expt. n.º 1 de mezcla de BSA
Concentración de anticuerpos en función de EDTA

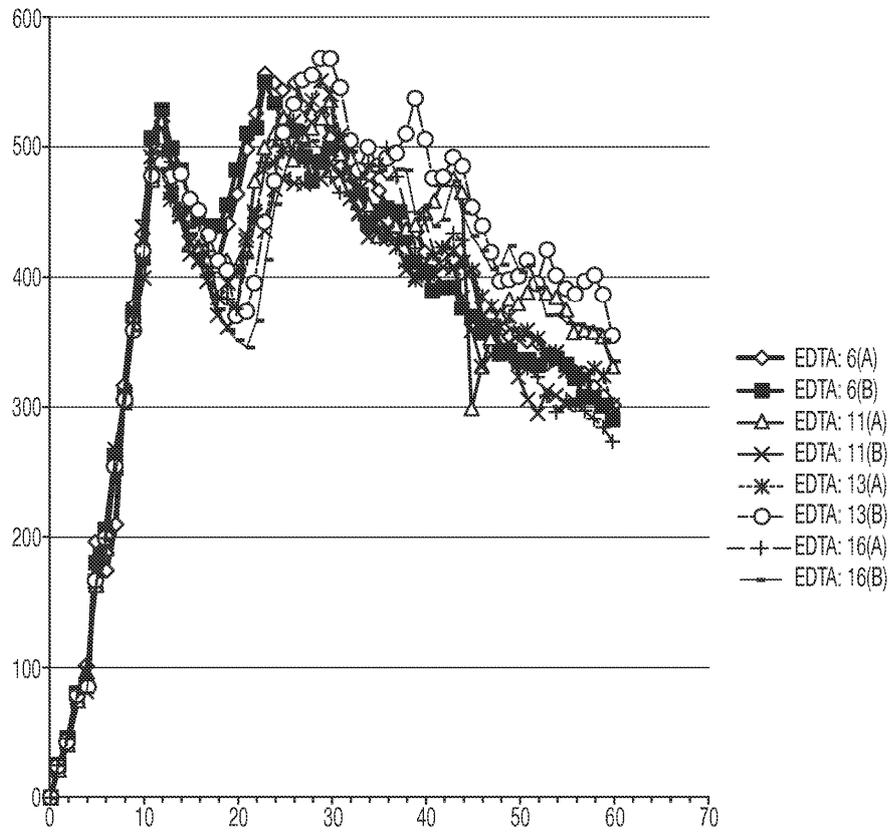


FIG. 13E

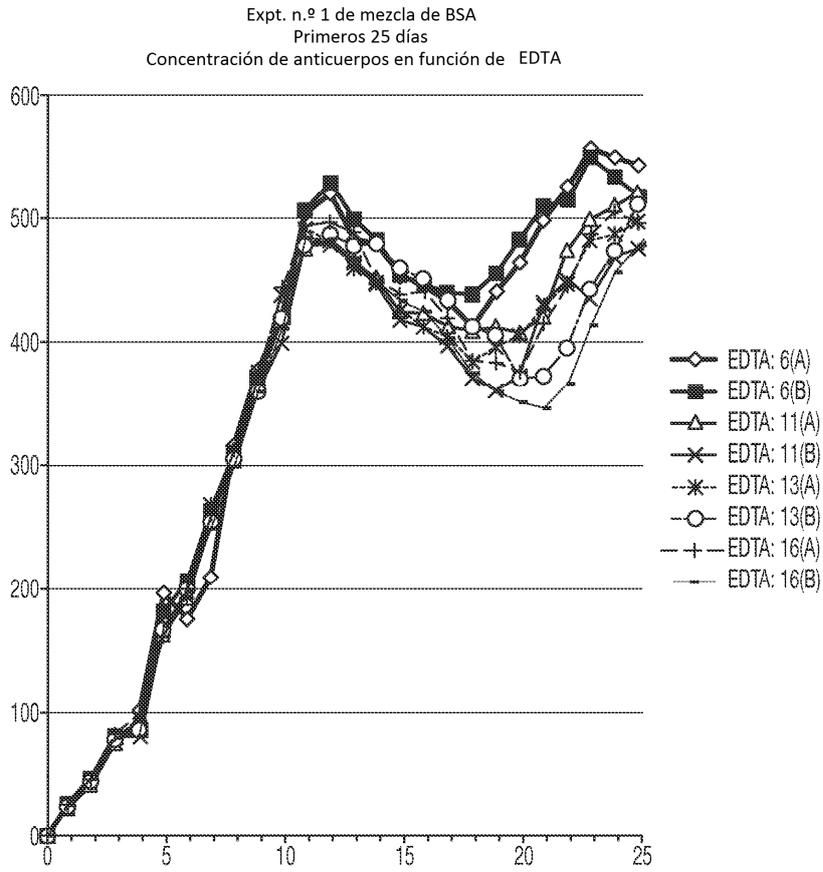


FIG. 13F

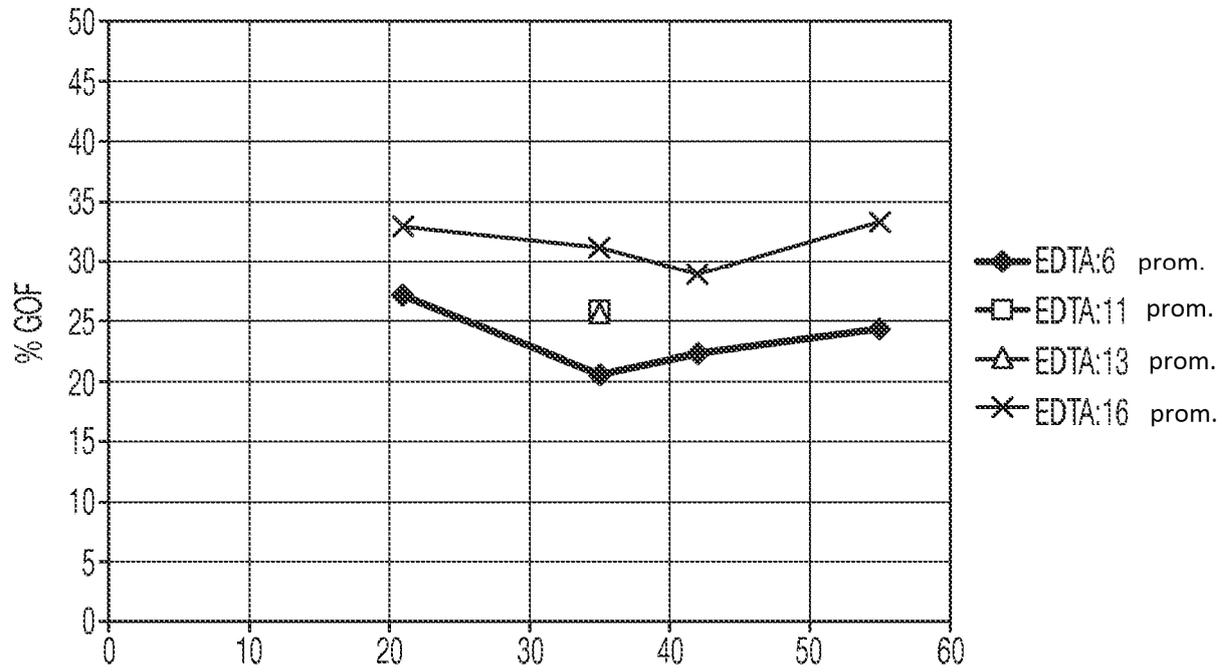


FIG. 13G

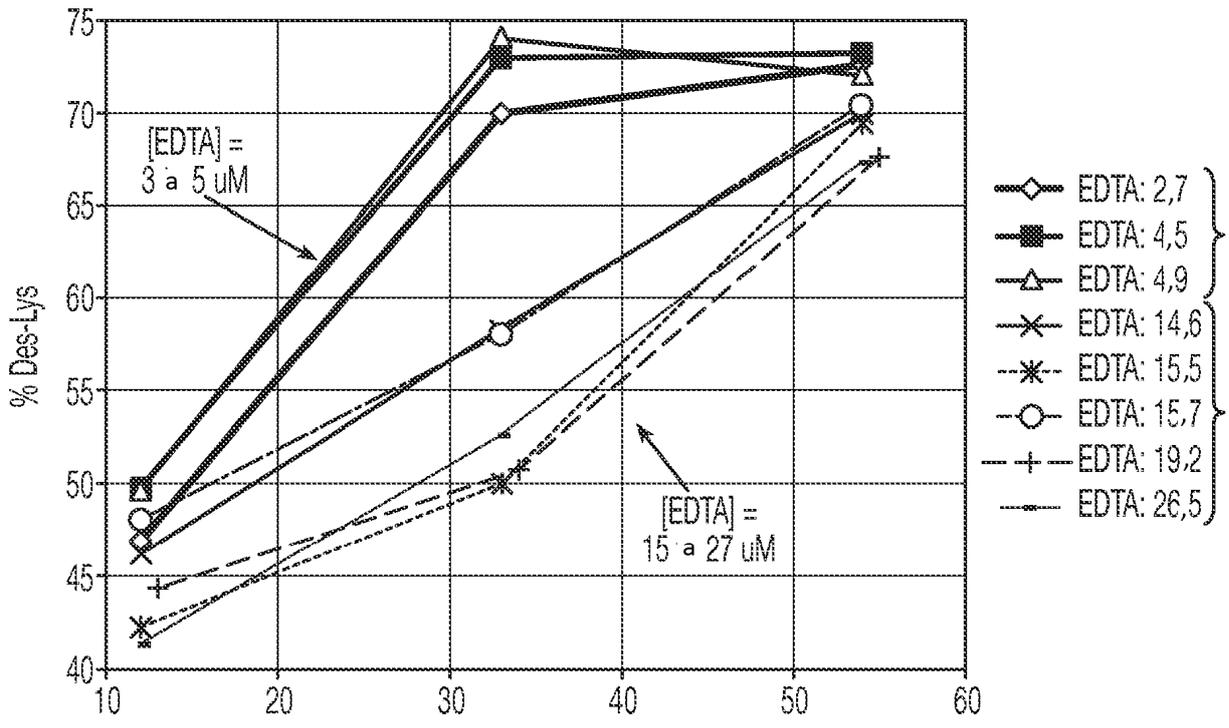


FIG. 14A

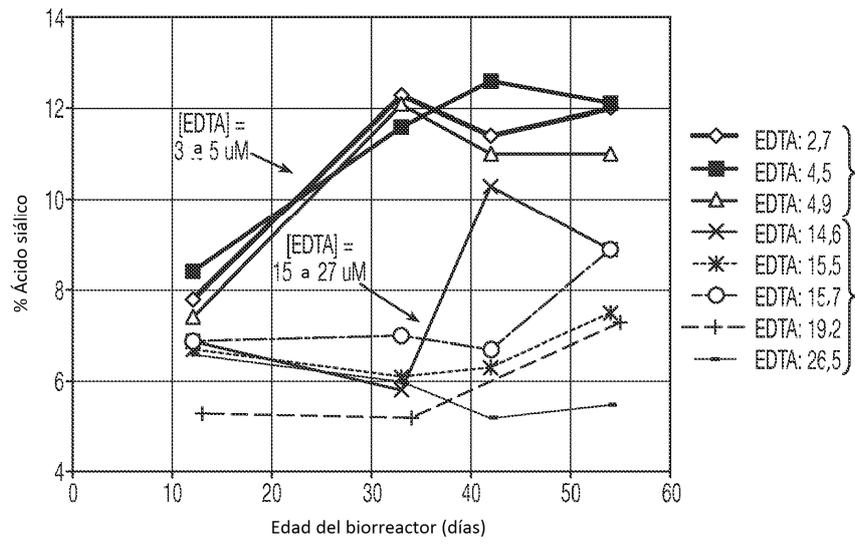


FIG. 14B

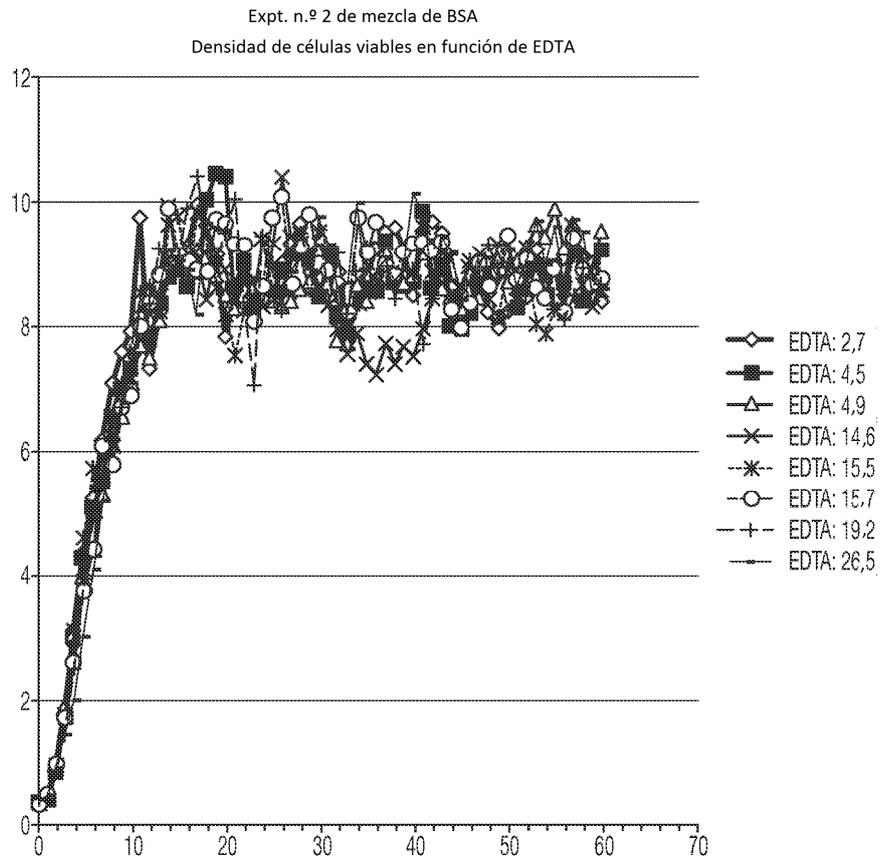


FIG. 14C

Expt. n.º 2 de mezcla de BSA

Expt. n.º 2 de mezcla de BSA
Viabilidad del cultivo en función de EDTA

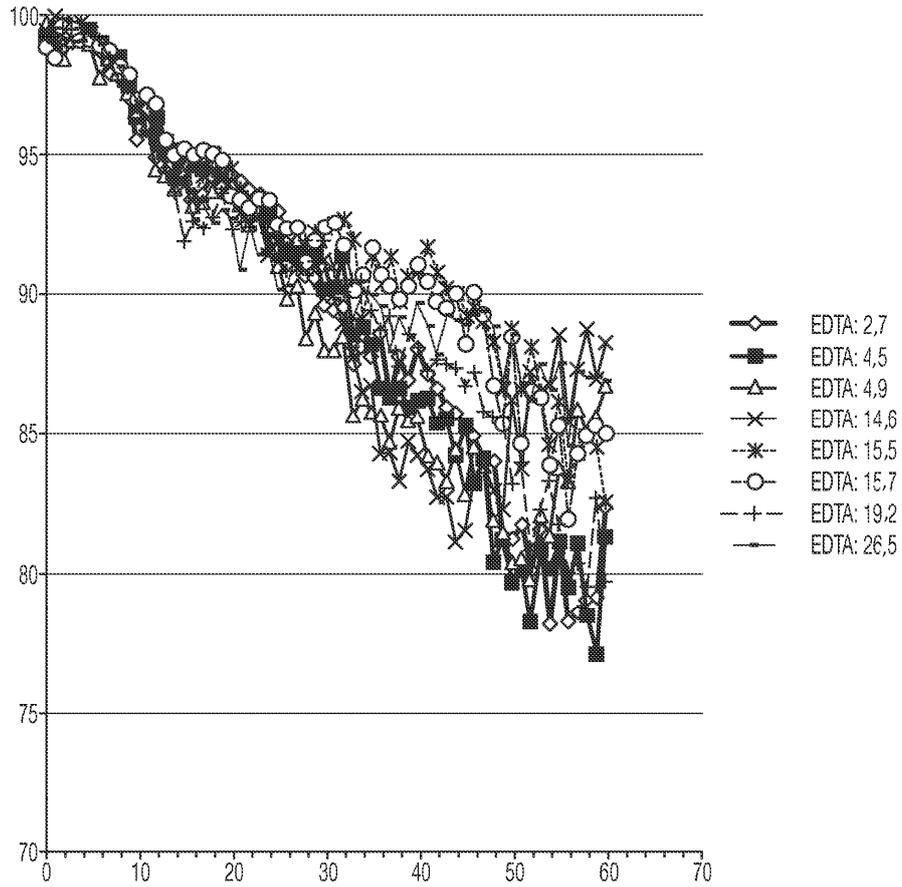


FIG. 14D

Expt. n.º 2 de mezcla de BSA

Expt. n.º 2 de mezcla de BSA

Concentración de anticuerpos en función de EDTA

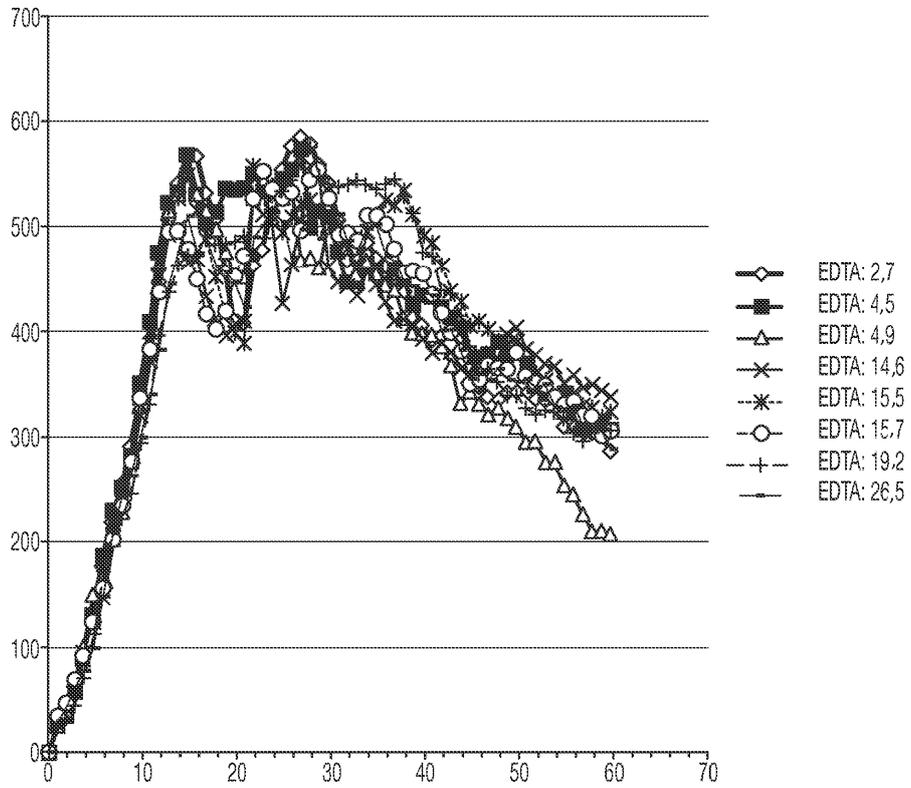


FIG. 14E

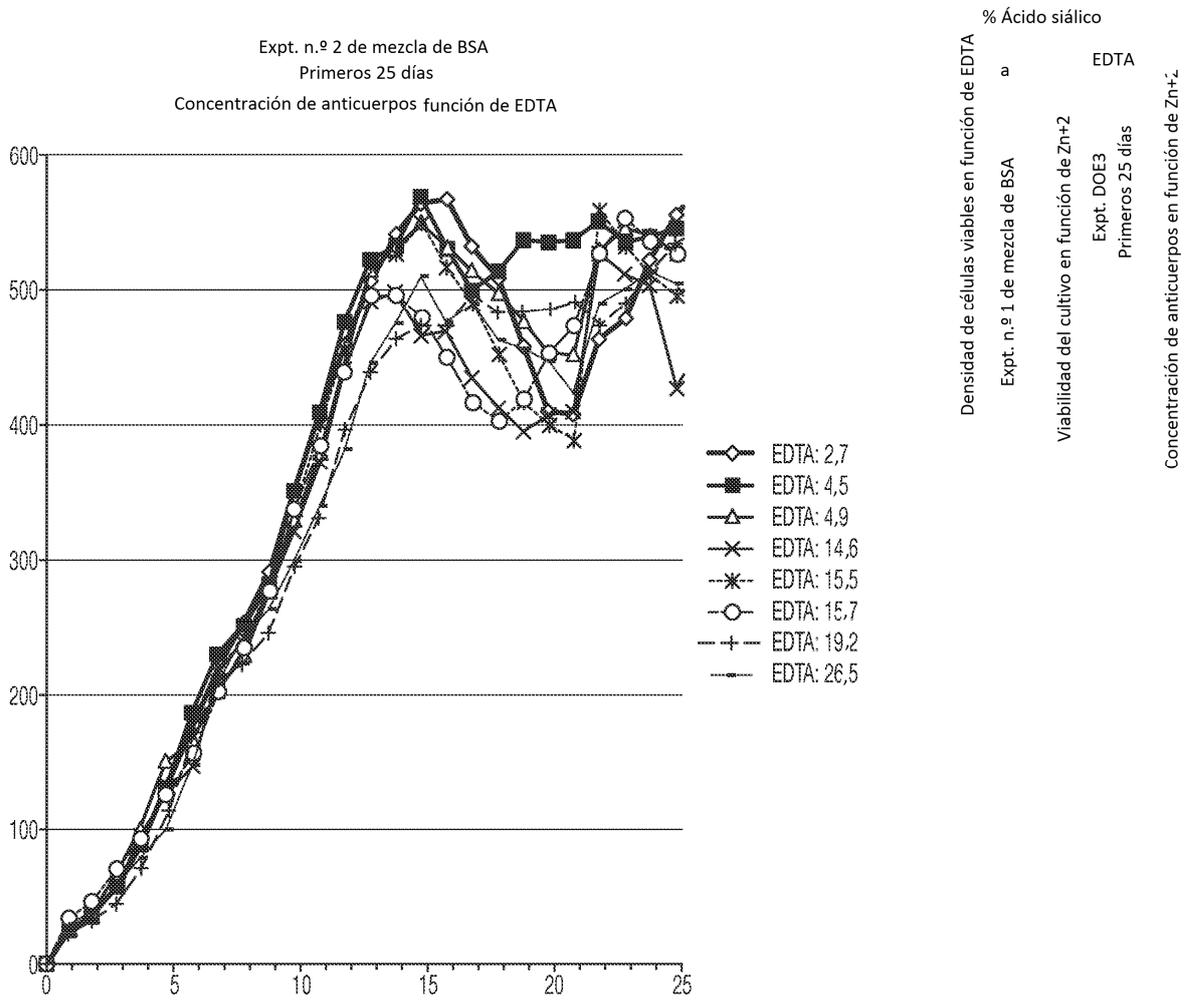


FIG. 14F

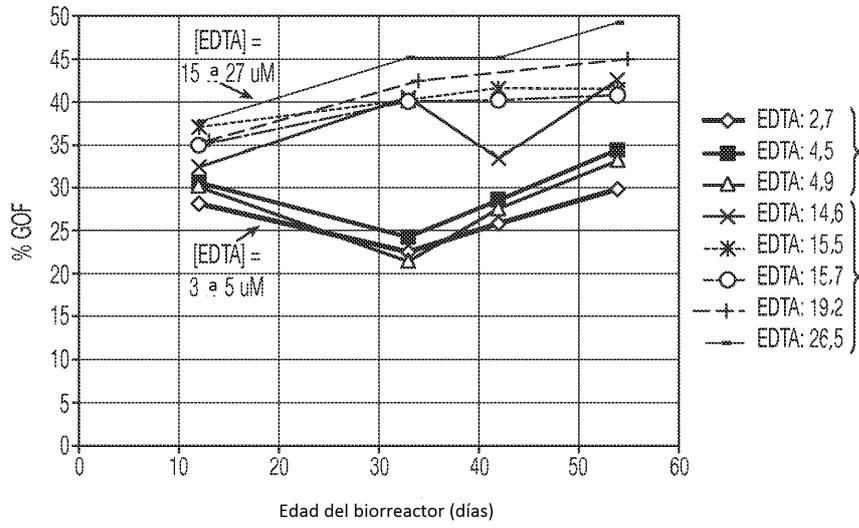


FIG. 15

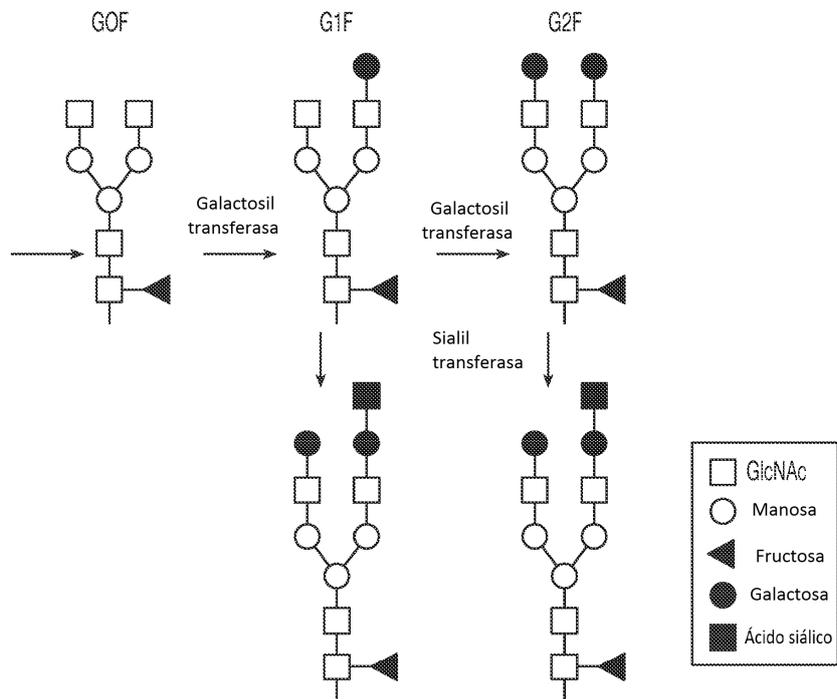


FIG. 16

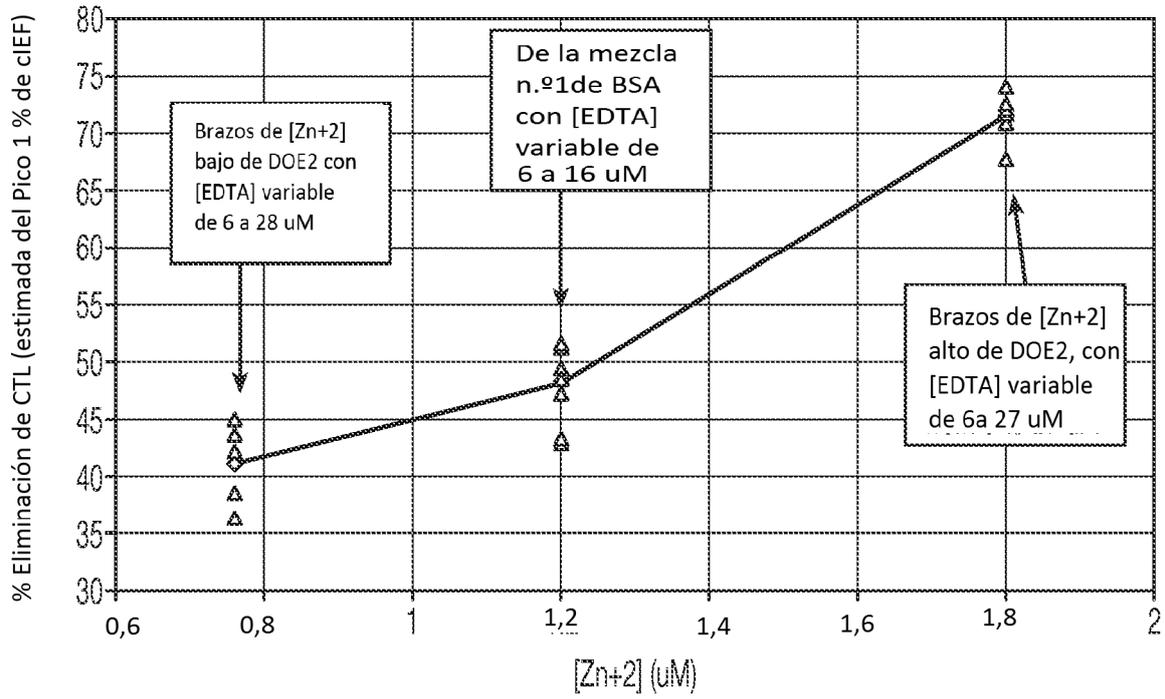


FIG. 17

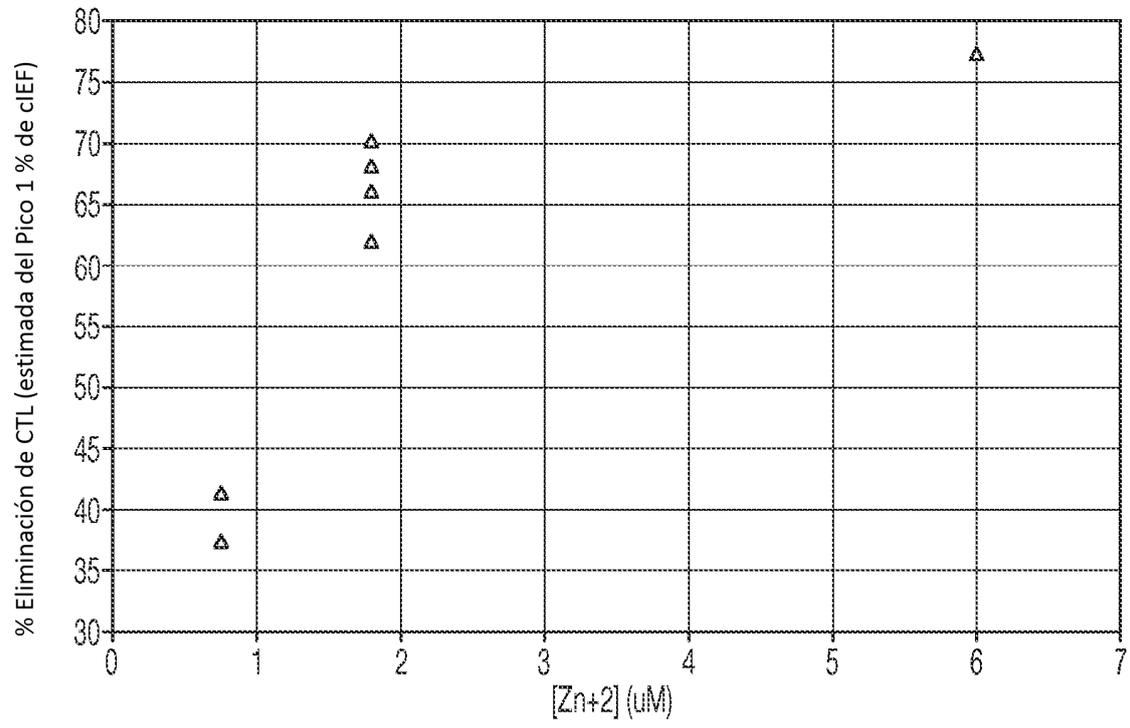


FIG. 18

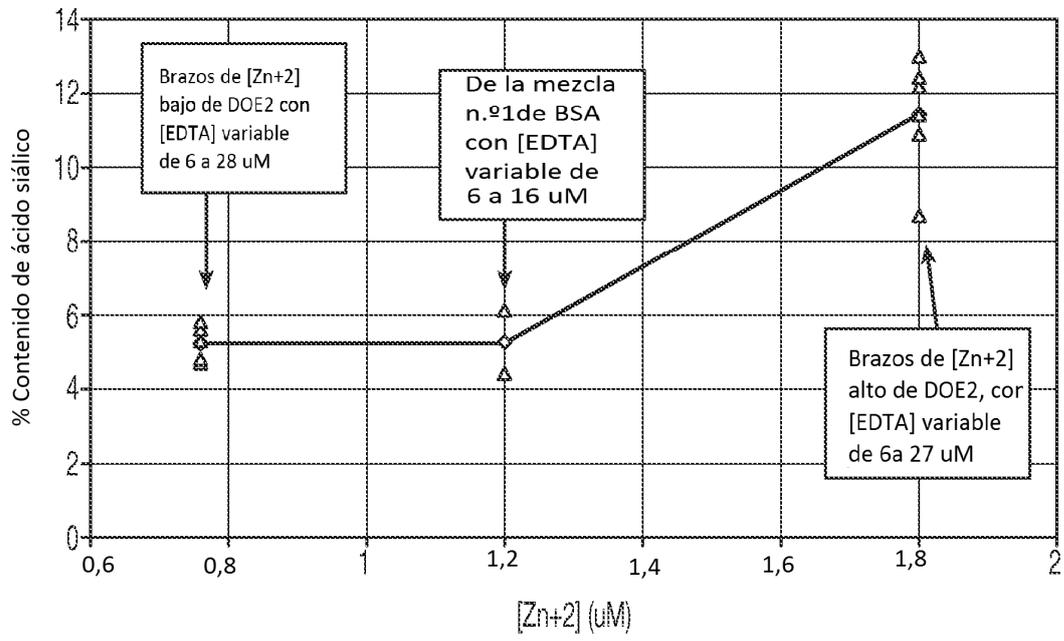


FIG. 19

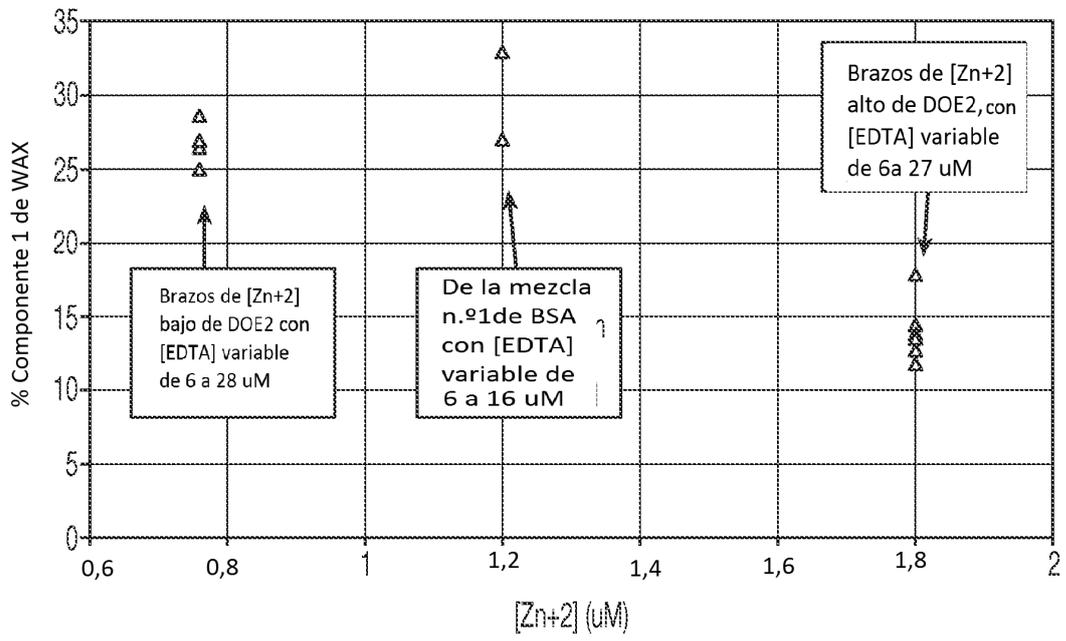


FIG. 20

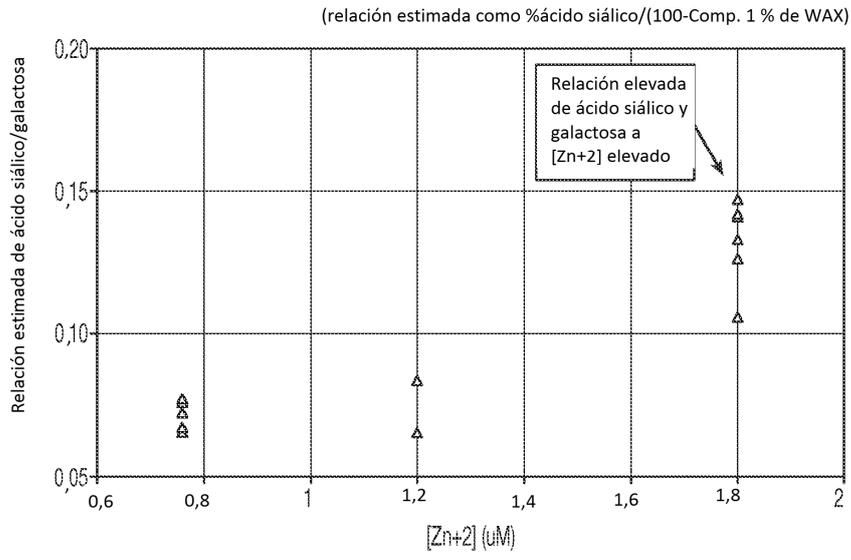


FIG. 21

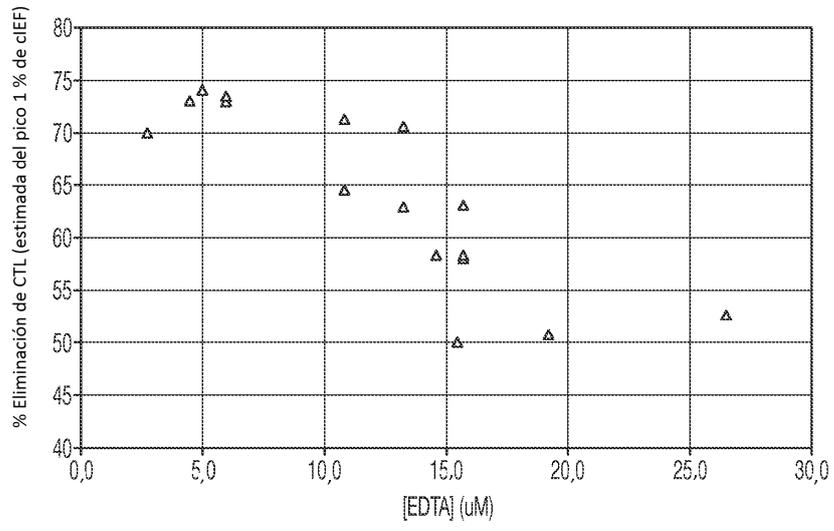


FIG. 22

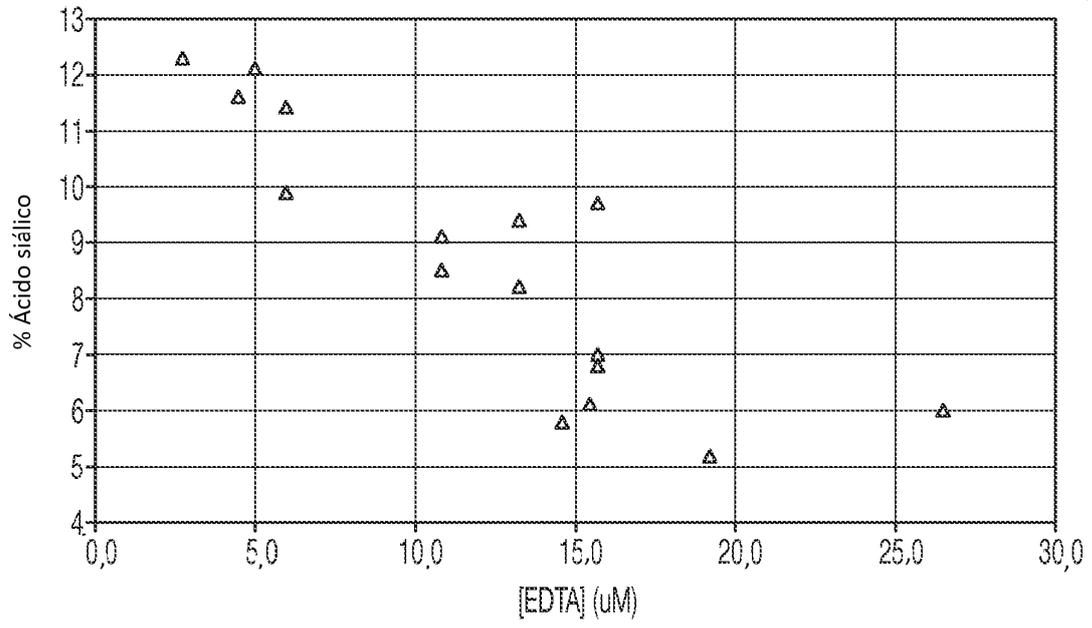


FIG. 23

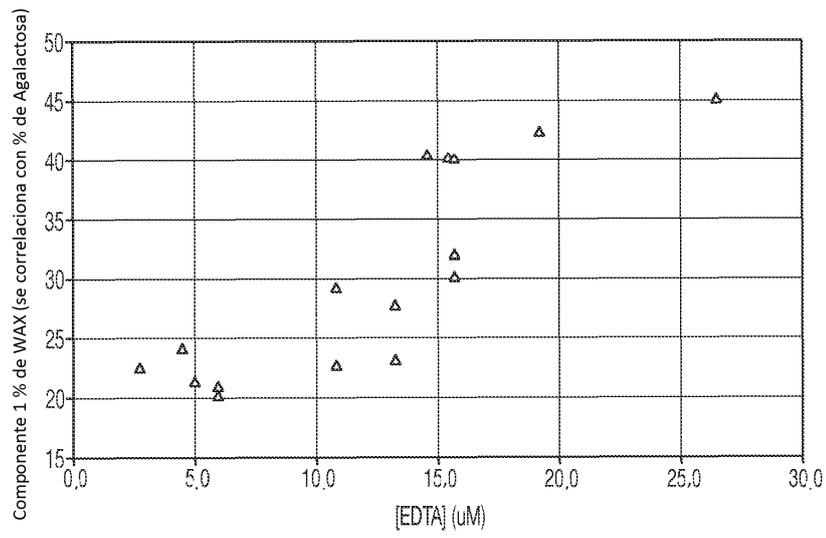


FIG. 24

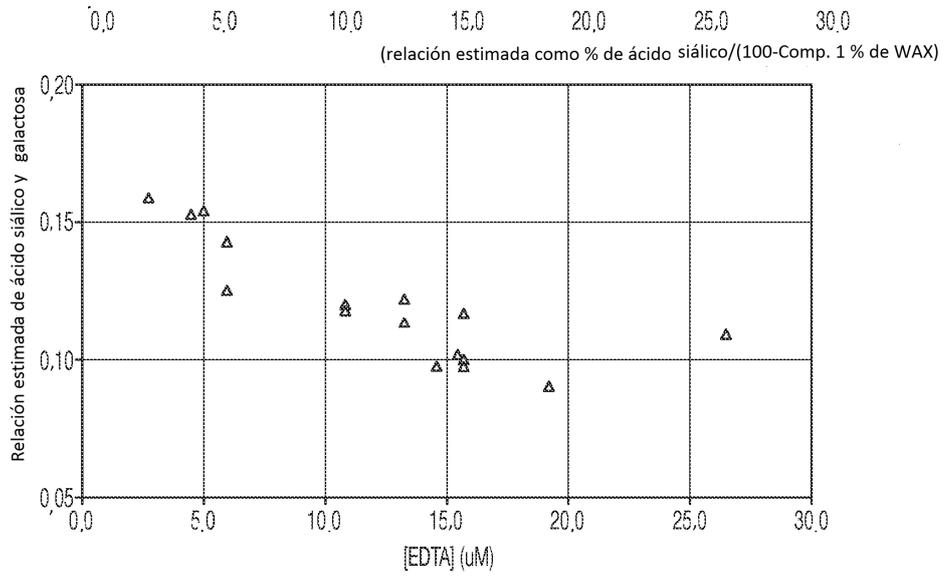


FIG. 25

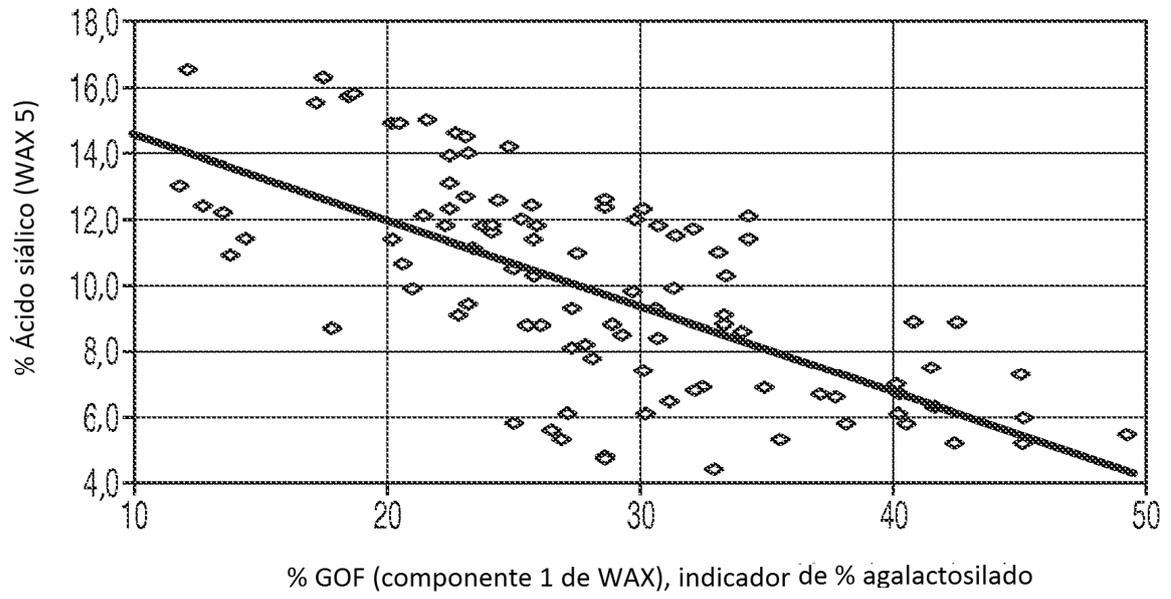


FIG. 26

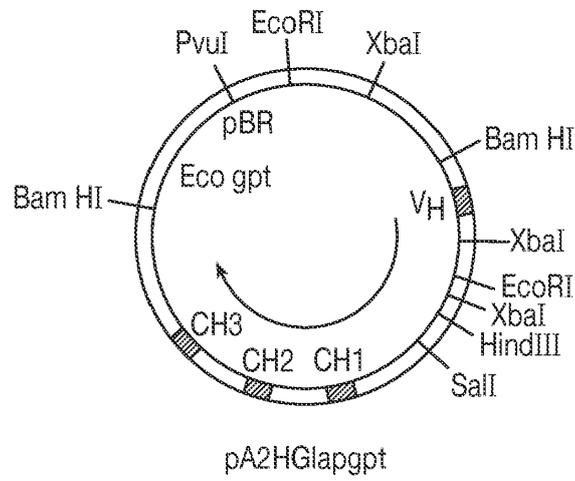


FIG. 27A

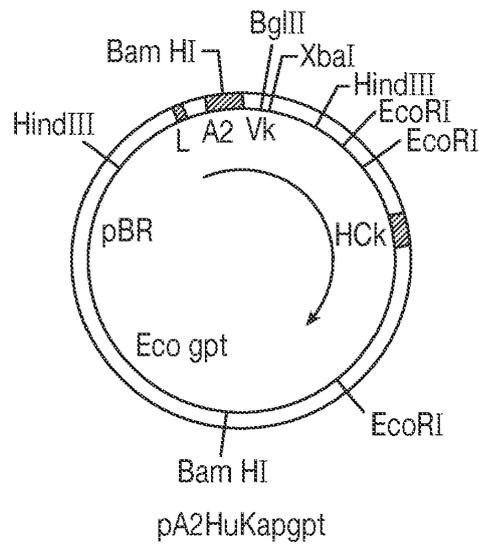


FIG. 27B

1 Val Arg Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
 10
 21 Gln Ala Glu Gly Gln Leu Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly
 30
 41 Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
 50
 61 Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 70
 81 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
 90
 101 Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu
 110
 121 Gly Gly val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
 130
 141 Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 150

FIG. 28

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
 AspIleLeuLeuThrGlnSerProAlaIleLeuSerValSerProGlyGluArgValSer

 TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTTCGTTGGCTCAAGCATCCACTGGTATCAGCAAAGAACA
 PheSerCysArgAlaSerGlnPheValGlySerSerIleHisTrpTyrGlnGlnArgThr

 AATCGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATGTCTGGGATCCCCTTCC
 AsnGlySerProArgLeuLeuIleLysTyrAlaSerGluSerMetSerGlyIleProSer

 AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACACTGTGGAGTCT
 ArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuSerIleAsnThrValGluSer

 GAGATATTGCAGATTATTACTGTCAAGAAAGTCAATAGCTGGCCATTCACGTTCCGGCTCG
 GluAspIleAlaAspTyrTyrCysGlnGlnSerHisSerTrpProPheThrPheGlySer

 GGGACAAATTTGGAAGTAAA
 GlyThrAsnLeuGluValLys

FIG. 29A

GAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCACCTGGAGGATCCATGAAACTC
 GluValLysLeuGluGluSerGlyGlyLeuValGlnProGlyGlySerMetLysLeu
 TCCTGTGTTCCCTCTGGATTCAPIITTCAGTAACCACTGGATGAACCTGGTCCGCCAGTCT
 SerCysValAlaSerGlyPheIlePheSerAsnHisTrpMetAsnTrpValArgGlnSer
 CCAGAGAGGGGCTTGAGTGGTCTGAAATTAGATCAAATCTAATTAATTCIGCAACA
 ProGluLysGlyLeuGluTrpValAlaGluIleArgSerLysSerIleAsnSerAlaThr
 CATTATCCGGAGTCTGTGAAAGGAGGTTCAACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAGTGCT
 HisTyrAlaGluSerValLysGlyArgPheThrIleSerArgAspSerLysSerAla
 GTGTACCTGCAAAATGACCGACTTAAGAACTGAAGACACTGGCGTTTATTACTGTCCAGG
 ValTyrLeuGlnMetThrAspLeuArgThrGluAspThrGlyValTyrTyrCysSerArg
 AATTACTCGGTAGTACTACGACTACTGGGCCCAAGGCCACTCTCACAGTGTCC
 AsnTyrTyrGlySerThrTyrAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThrLeuThrValSer

FIG. 29B