

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 269**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 1/14** (2006.01)

**A61K 47/68** (2007.01)

**C07K 1/107** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/US2014/066889**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15077605**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14863650 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3074036**

54 Título: **Preparación de anticuerpos a partir del cultivo de células CHO para conjugación**

30 Prioridad:

**25.11.2013 US 201361908568 P**

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

**07.04.2020**

73 Titular/es:

**SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)  
21823 30th Drive, S.E.  
Bothell, WA 98021, US**

72 Inventor/es:

**HAYES, BRADLEY;  
BEAM, KEVIN;  
MEYER, DAMON;  
LYON, ROBERT y  
VALLIERE-DOUGLASS, JOHN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 753 269 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

Preparación de anticuerpos a partir del cultivo de células CHO para conjugación

### Antecedentes

5 Después de cientos de ensayos clínicos, hasta la fecha, la FDA ha aprobado aproximadamente treinta anticuerpos monoclonales para tratar una variedad de indicaciones que incluyen cáncer, enfermedades autoinmunes y agentes infecciosos. Un motivo por el que no se han aprobado más anticuerpos es que los mecanismos de acción proporcionados por un anticuerpo solo, tal como la función efectora o el bloqueo de las interacciones receptor-ligando pueden no ser lo suficientemente potentes como para tener un efecto terapéutico sustancial. Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) proporcionan mecanismos adicionales, particularmente la administración de un resto tóxico acoplado al anticuerpo al interior de una célula, de este modo destruye la célula o inhibe de otro modo su proliferación. Actualmente se comercializan dos ADC: brentuximab vedotina y trastuzumab emtansina. Muchos otros ADC se encuentran en diversas etapas de desarrollo. La producción de ADC implica la expresión y purificación de anticuerpos, seguida de la conjugación química del anticuerpo con un fármaco, generalmente a través de un ligando.

10 El documento US 2013/309223 divulga anticuerpos murinos, quiméricos y humanizados que se unen específicamente a CD33. Los anticuerpos se usan para tratar y diagnosticar varios tipos de cáncer, así como para detectar CD33.

Catherine E.M. Hogwood et al., 2012 divulga la dinámica del perfil de proteína de la célula huésped CHO durante la clarificación y la captura de proteína A en un proceso de purificación de anticuerpos de plataforma.

Hui F. Liu et al., 2010 divulga procesos de recuperación y purificación para anticuerpos monoclonales terapéuticos.

### 20 Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Impacto de la impureza oxidante en la carga del fármaco. Las muestras se redujeron y se conjugaron en los tiempos indicados. La tendencia en la cual el nivel de conjugación disminuye con el tiempo indica la presencia de una impureza oxidante.

25 Fig. 2a-2c: Actividad oxidante en una preparación de anticuerpos (lote DEVNKB-1) en fracciones después de la separación SEC (Fig. 2a). La transferencia Western de fracciones SEC teñidas con anti-ALR (Activador de la regeneración hepática) y anticuerpos anti-QSOX1 (Figuras 2b y 2c, respectivamente).

30 Figs. 3a-c: Fraccionamiento de una preparación de anticuerpos (lote DEVNKB-1) en una columna de proteína A Poros (Fig. 3a); actividad oxidante en cada fracción (Fig. 3b); e imagen del gel SDS-PAGE que muestra el contenido de proteínas de las fracciones mezclada 3 y 4 (Fig. 3c). La flecha indica un peso molecular consistente con 70 kDa QSOX1 y 76 kDa QSOX2.

### Definiciones

35 Un anticuerpo aislado o ADC es típicamente al menos 50% p/p puro de proteínas interferentes y otros contaminantes que surgen de su producción o purificación, pero no excluye la posibilidad de que el anticuerpo monoclonal se combine con un exceso de portador u otro vehículo farmacéuticamente aceptable destinado a facilitar su uso. Algunas veces, los anticuerpos monoclonales o ADC son al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95 o 99% p/p puro de proteínas y contaminantes interferentes de la producción o purificación.

40 La unión específica de un anticuerpo monoclonal solo o como un componente de un ADC a su antígeno diana significa una afinidad de al menos  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  o  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>. La unión específica es detectablemente mayor en magnitud y se puede distinguir de la unión no específica que se produce al menos a una diana no relacionada. La unión específica puede ser el resultado de la formación de enlaces entre grupos funcionales particulares o ajustes espaciales particulares (por ejemplo, tipo de cerradura y llave), mientras que la unión no específica usualmente es el resultado de las fuerzas de van der Waals. Sin embargo, la unión específica no implica necesariamente que un anticuerpo monoclonal se una a una diana sola.

45 La unidad estructural básica del anticuerpo es un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos pares de cadenas de polipéptidos, cada par tiene una cadena "liviana" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígeno. Esta región variable se expresa inicialmente unida a un péptido señal escindible. La región variable sin el péptido señal a veces se denomina región variable madura. En consecuencia, por ejemplo, una región variable madura de la cadena liviana es una región variable de la cadena liviana sin el péptido señal de cadena liviana. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante. La región constante de la cadena pesada es la principal responsable de la función efectora.

Las cadenas livianas se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas livianas y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. (Ver en general, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7).

Las regiones maduras variables de cada par de cadena liviana/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos. Todas las cadenas exhiben la misma estructura general de regiones estructurales (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones estructurales, lo que permite la unión a un epítipo específico. Desde N-terminal a C-terminal, tanto las cadenas livianas como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), or Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989). Kabat también proporciona una convención de numeración ampliamente utilizada (numeración de Kabat) en la que a los residuos correspondientes entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas livianas se les asigna el mismo número.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos intactos y fragmentos de unión de los mismos. Por lo general, los fragmentos de anticuerpos compiten con el anticuerpo intacto del que se derivaron para la unión específica al blanco, incluidas cadenas pesadas separadas, cadenas livianas Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>c, diacuerpos, Dabs, nanocuerpos y Fv. Los fragmentos se pueden producir por técnicas de ADN recombinante, o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" también incluye un diacuerpo (fragmento Fv homodimérico) o un minicuerpo (V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3), un anticuerpo biespecífico o similar. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/livianas diferentes y dos sitios de unión diferentes (ver, por ejemplo, Songvilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)). El término "anticuerpo" incluye un anticuerpo por sí mismo (anticuerpo desnudo) o un anticuerpo conjugado con un fármaco citotóxico o citostático.

El término "epítipo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Se puede formar un epítipo a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una o más proteínas. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más usualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los procedimientos para determinar la conformación espacial de los epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Ver, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Los anticuerpos que reconocen los mismos epítipos o superpuestos se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para competir con la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. El epítipo de un anticuerpo también se puede definir mediante cristalografía de rayos X del anticuerpo unido a su antígeno para identificar residuos de contacto. Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítipos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

La competición entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que un anticuerpo bajo prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común (ver, por ejemplo, Junghans et al., *Cancer Res.* 50: 1495, 1990). Un anticuerpo de prueba compite con un anticuerpo de referencia si un exceso de un anticuerpo de prueba (por ejemplo, al menos 2x, 5x, 10x, 20x o 100x) inhibe la unión del anticuerpo de referencia en al menos 50%, pero preferiblemente 75%, 90% o 99 % medido en un ensayo de unión competitivo. Los anticuerpos identificados por el ensayo de competición (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que se produzca un impedimento estérico.

El término "paciente" incluye seres humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

Para los fines de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservadoras o no conservadoras, los aminoácidos se agrupan de la siguiente manera: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras):

cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservadoras implican sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservadoras constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

El porcentaje de identidades de secuencia se determina con secuencias de anticuerpos alineadas al máximo por la convención de numeración de Kabat. Después del alineamiento, si una región del anticuerpo presente (por ejemplo, la región variable madura completa de una cadena pesada o liviana) se compara con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones de anticuerpo presentes y de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en la región de anticuerpo presente como de referencia dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, con espacios sin contar, multiplicados por 100 para convertir a porcentaje.

Las composiciones o procedimientos que "comprenden" uno o más elementos mencionados pueden incluir otros elementos no específicamente mencionados. Por ejemplo, una composición que comprende anticuerpos puede contener el anticuerpo solo o en combinación con otros ingredientes.

La designación de un intervalo de valores incluye todos los números enteros dentro o que definen el intervalo.

Una función efectora de anticuerpos se refiere a una función contribuida por un dominio Fc de una Ig. Dichas funciones pueden ser, por ejemplo, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos o citotoxicidad dependiente del complemento. Tal función se puede efectuar, por ejemplo, mediante la unión de un dominio efector de Fc a un receptor de Fc en una célula inmune con actividad fagocítica o lítica o mediante la unión de un dominio efector de Fc a componentes del sistema del complemento. Típicamente, el efecto medida por las células de unión a Fc o los componentes del complemento producen la inhibición y/o reducción de la célula objetivo. Las regiones Fc de los anticuerpos pueden reclutar células que expresan el receptor Fc (FcR) y yuxtaponerlas con células diana revestidas con anticuerpos. Las células que expresan FcR de superficie para IgG que incluyen FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD64) pueden actuar como células efectoras para la destrucción de células revestidas de IgG. Dichas células efectoras incluyen monocitos, macrófagos, células citolíticas naturales (NK), neutrófilos y eosinófilos. El acoplamiento de FcγR por IgG activa la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). La ADCC está mediada por células efectoras CD16+ a través de la secreción de proteínas y proteasas formadoras de poros de membrana, mientras que la fagocitosis está mediada por células efectoras CD32+ y CD64+ (ver *Fundamental Immunology*, 4th ed., Paul ed., Lippincott- Raven, N.Y., 1997, Chapters 3, 17 and 30; Uchida et al., 2004, *J. Exp. Med.* 199:1659-69; Akewanlop et al., 2001, *Cancer Res.* 61:4061-65; Watanabe et al., 1999, *Breast Cancer Res. Treat.* 53:199-207). Además de ADCC y ADCP, las regiones Fc de los anticuerpos unidos a las células también pueden activar la vía clásica del complemento para provocar citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). C1q del sistema del complemento se une a las regiones Fc de los anticuerpos cuando se complejan con los antígenos. La unión de C1q a los anticuerpos unidos a las células puede iniciar una cascada de eventos que implican la activación proteolítica de C4 y C2 para generar la convertasa C3. La escisión de C3 a C3b por la convertasa C3 permite la activación de componentes del complemento terminal, que incluye C5b, C6, C7, C8 y C9. Colectivamente, estas proteínas forman poros complejos de ataque de membrana en las células revestidas de anticuerpos. Estos poros alteran la integridad de la membrana celular, y destruyen la célula diana (ver *Immunobiology*, 6th ed., Janeway et al., Garland Science, N. Y., 2005, Capítulo 2).

La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos", o ADCC, es un mecanismo para inducir la muerte celular que depende de la interacción de las células diana revestidas de anticuerpos con las células inmunes que poseen actividad lítica (también denominadas células efectoras). Dichas células efectoras incluyen células citolíticas naturales, monocitos/macrófagos y neutrófilos. Las células efectoras se unen a un dominio efector Fc de Ig unidos a las células diana a través de sus sitios de combinación de antígeno. La muerte de la célula diana revestida de anticuerpo se produce como resultado de la actividad de la célula efectora.

La expresión "fagocitosis celular dependiente de anticuerpos", o ADCP, se refiere al proceso por el cual las células revestidas de anticuerpos son internalizadas, total o parcialmente, por células inmunes fagocíticas (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) que se unen a un dominio efector Fc de Ig.

La expresión "citotoxicidad dependiente del complemento", o CDC, se refiere a un mecanismo para inducir la muerte celular en el que un dominio efector Fc de un anticuerpo unido a la diana activa una serie de reacciones enzimáticas que culminan en la formación de orificios en la membrana celular diana. Típicamente, los complejos antígeno-anticuerpo, tales como los de las células diana revestidas de anticuerpo, se unen y activan el componente del complemento C1q, que a su vez activa la cascada del complemento que conduce a la muerte de la célula diana. La activación del complemento también puede producir la deposición de componentes del complemento en la superficie de la célula diana que facilitan la ADCC mediante la unión a los receptores del complemento (por ejemplo, CR3) en los leucocitos.

Un "efecto citotóxico" se refiere a la reducción, eliminación y/o muerte de una célula diana. Un "agente citotóxico" se refiere a un agente que tiene un efecto citotóxico en una célula. Los agentes citotóxicos se pueden conjugar con un anticuerpo o administrar en combinación con un anticuerpo.

Un "efecto citostático" se refiere a la inhibición de la proliferación celular. Un "agente citostático" se refiere a un agente que tiene un efecto citostático en una célula, de este modo inhibe el crecimiento y/o expansión de un subconjunto específico de células. Los agentes citostáticos se pueden conjugar con un anticuerpo o administrarse en combinación con un anticuerpo.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado o aprobable por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de EE. UU. U otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. La expresión "ingrediente farmacéuticamente compatible" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable con el que se combina un anticuerpo o ADC.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un anticuerpo o conjugado del mismo o agente administrado con un anticuerpo. Los ejemplos de sales incluyen sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilénbis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabiliza la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

Las células CHO se refieren a células de ovario de hámster chino e incluyen diversas cepas que incluyen, por ejemplo, DG44, Dxb11, CHO-K, CHO-K1 y CHO-S.

La expresión "carga de fármaco" o "relación de conjugación" se refiere al número promedio de fármacos por anticuerpo en una solución o composición de ADC o mezcla de reacción.

A menos que sea evidente por el contexto, el término "aproximadamente" abarca valores dentro de una desviación estándar de un valor establecido.

## Descripción detallada

### I. General

La invención está definida por las reivindicaciones.

La invención se basa en parte en la observación de que una enzima oxidante de células CHO, particularmente la quiescina Q6 sulfhidriloxidasa 1 (QSOX1), puede sobrevivir a un proceso de purificación de anticuerpos aparentemente riguroso y estar presente en una cantidad suficiente en una preparación de anticuerpos para disminuir la eficiencia de carga de conjugación posterior del anticuerpo a un fármaco. Aunque puede parecer que el proceso de purificación da como resultado un anticuerpo que tiene una proporción aceptablemente baja de contaminantes/impurezas de fondo para el anticuerpo, no obstante, pueden estar presentes cantidades suficientes de la enzima oxidante que producen grupos sulfhidrilo en el anticuerpo que se oxidan después de la reducción del anticuerpo y, por lo tanto, no están disponible para la conjugación a un fármaco. Aunque la práctica de la invención no depende de la comprensión del mecanismo, la persistencia de QSOX1 en el producto de anticuerpo purificado puede ser el resultado de la interacción entre el anticuerpo y QSOX1 en algunas condiciones de purificación. Si la enzima oxidante sobrevive al procedimiento de purificación depende de qué técnicas de purificación se empleen, que pueden variar de un anticuerpo a otro. Antes de identificar el potencial para determinar la presencia de una preparación de anticuerpo aparentemente pura con pequeñas pero significativas cantidades de enzima oxidante de células CHO, una pobre eficiencia de carga de conjugación (reflejada por una relación media inadecuada de fármacos a anticuerpo) se pueden haber atribuido incorrectamente a cualquiera de numerosas causas. Sin embargo, sabiendo que la contaminación con una enzima oxidante de células CHO es un problema potencial para la conjugación posterior, se puede diseñar un esquema de purificación adecuado para cualquier anticuerpo que elimine o al menos reduzca la enzima oxidante de CHO a un nivel aceptable.

### II. Enzimas oxidantes de células CHO

QSOX1 es la homóloga de hámster chino de QSOX1 humana, Swiss-Prot 000391. La enzima cataliza la oxidación de grupos sulfhidrilo a disulfuros con la reducción de oxígeno. La referencia a QSOX1 se refiere a una enzima QSOX1 de longitud completa (con o sin el péptido señal) y cualquier fragmento del mismo, que incluye las variantes naturales del mismo, que retienen la capacidad oxidante de sulfhidrilo, ya sea liberado naturalmente por las células CHO o liberado como resultado de un proceso de purificación de anticuerpo. QSOX1 en los medios de cultivo de células CHO da una banda de intervalo de tamaño aparente de 65-75 kDa, o más específicamente, 68-72 kDa. Los ejemplos de fragmentos de QSOX1 pueden comprender un dominio extracelular, un dominio de tiorredoxina y/o un dominio de ERV/ALR sulfhidrilo oxidasa. Una secuencia de proteína de isoforma X1 de QSOX1 predicha se ha identificado previamente como la establecida en la SEQ ID NO: 1 y se encontró como número de acceso de GenBank XP\_003500174.1. La secuencia de proteína de la isoforma X1 predicha QSOX1 se ha actualizado desde entonces. La secuencia actualizada es como se expone en la SEQ ID NO: 2 y se puede encontrar como número de acceso de

GenBank XP\_007639037.1. En algunos aspectos, QSOX1 se refiere a una enzima oxidante de células CHO que tiene 90% o más (91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o 100%) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y que retiene la capacidad oxidante de sulfhidrilo. En algunos aspectos, QSOX1 se refiere a una enzima oxidante de células CHO que comprende la secuencia de aminoácidos que varía desde el 94º aminoácido hasta el aminoácido 571 de la SEQ ID NO: 2 y que retiene la capacidad oxidante de sulfhidrilo.

Otras enzimas de células CHO que pueden estar presentes como impurezas incluyen QSOX2 (homólogo de CHO de Swiss-Prot Q6ZRP7 humano) y la ALR (activador de la regeneración hepática) sulfhidrilo oxidasa. Para abreviar, la siguiente descripción se refiere principalmente a QSOX1, pero se debe entender que se refiere de forma alternativa o adicional a QSOX2, ALR u otras enzimas oxidantes de células CHO que sobreviven a la purificación.

### III. Procedimientos de purificación para eliminar QSOX1 y otras enzimas oxidantes de células CHO

La solicitud proporciona varias técnicas disponibles para identificar y eliminar QSOX1 y otras enzimas oxidantes de células CHO, tales como QSOX2 o ALR (ver Ejemplos para más detalles). Una técnica es cargar una preparación de anticuerpo en una columna de proteína A y lavar en condiciones de sal moderadas o altas (por ejemplo, NaCl 150 mM o NaCl 150-500 mM). QSOX1 eluye de la columna mientras que el anticuerpo permanece unido. Otra técnica es la filtración en profundidad que usa, por ejemplo, una membrana Millipore X0HC. El anticuerpo pasa a través del filtro, mientras que QSOX1 queda atrapado por el filtro. Otra técnica es la cromatografía de intercambio aniónico, preferiblemente usando un intercambiador aniónico fuerte con grupos de amonio cuaternario. Una columna Capto-Q de GE Healthcare es adecuada. En condiciones apropiadas (por ejemplo, pH de aproximadamente 8 y conductividad de aproximadamente 5-7 mS/cm) el anticuerpo fluye a través de la columna, mientras que QSOX1 permanece unido. Otra técnica es la filtración con membrana de fenilo. Este tipo de membrana separa en función de las interacciones hidrófobas. En condiciones apropiadas (por ejemplo, pH 6-8 y citrato de sodio 0,35-0,4M), el anticuerpo pasa y QSOX1 se une a la membrana.

### IV. Pruebas para eliminación

QSOX1 se puede detectar mediante una variedad de ensayos, como se describe adicionalmente en los Ejemplos, que incluyen la transferencia Western con un anticuerpo específico para QSOX1. QSOX1 también se puede detectar mediante análisis de secuencia de péptidos o LC-MS/MS en una banda de peso molecular apropiado (aproximadamente 65-70 kDa de acuerdo con el estado de glicosilación) escindida de un gel. QSOX1 también se puede detectar mediante un ensayo funcional. La actividad QSOX1 genera peróxido de hidrógeno, que a su vez se puede detectar mediante un simple cambio de color resultante de la oxidación de Fe<sup>2+</sup> en presencia de naranja de xilenol. La actividad funcional característica de QSOX1 es inhibida específicamente por Zn<sup>2+</sup> (por ejemplo, al menos 90%) pero no por EDTA y muchas otras sales (KI, MnSO<sub>4</sub>, NaCl) o urea. QSOX1 también se puede detectar mediante un ensayo DTNB como se demuestra en el Ejemplo 2.

QSOX1 se considera presente si es detectable por encima de los niveles de control negativo (más allá del error experimental) en cualquiera de los ensayos descritos a continuación o en los ejemplos. En algunos aspectos, los niveles de QSOX1 tan bajos como 1 ug/ml o 66 ppm pueden inhibir la eficiencia de carga de fármacos de anticuerpos. Por lo tanto, en algunos aspectos, un nivel aceptable puede significar menos de 0,5 ug/ml o 33 ppm, y preferiblemente menos de 0,1 ug/ml o 6 ppm, o menos de 0,01 ug/ml o 0,6 ppm. Preferiblemente, el nivel de QSOX1 está dentro de los niveles de control negativo según lo determinado por cualquiera de los formatos de ensayos descritos en los Ejemplos.

Alternativa o adicionalmente, un nivel aceptable de QSOX1 se puede definir como un nivel en o por debajo del cual se puede obtener una relación de conjugación aceptable de fármaco a anticuerpo. Una relación de conjugación aceptable es preferiblemente una que esté dentro del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la relación de conjugación deseada. Los parámetros que pueden afectar la relación de conjugación y se pueden controlar para lograr una relación de conjugación deseada incluyen, por ejemplo, las condiciones reductoras para el anticuerpo (por ejemplo, tipo de reductor y concentración en relación con la concentración de anticuerpo), la concentración del ligando de fármaco en relación con el anticuerpo, el tiempo de reacción de conjugación y temperatura de reacción de conjugación. Preferiblemente, el nivel de QSOX1 es tal que (a) no impide que se alcance el grado correcto de reducción durante la reacción de reducción del anticuerpo y/o (b) no reoxida los tioles reducidos inmediatamente después de la reducción, pero antes de conjugación. En otras palabras, preferiblemente, el nivel de QSOX1 es tal que no interfiere en la reducción del anticuerpo o la estabilidad del anticuerpo reducido.

Alternativa o adicionalmente, un nivel aceptable de QSOX1 se puede definir como un nivel que produce un valor de 0,1 o menos unidades de absorbancia en un ensayo de DTNB o un ensayo de oxidación ferrosa de naranja de xilenol. Brevemente, un ensayo DTNB es uno en el que se mide y compara la reacción entre los grupos tiol libres en una muestra de control y una muestra de prueba. Ver, por ejemplo, el Ejemplo 2. En un ensayo de oxidación ferrosa de naranja de xilenol, el peróxido de hidrógeno se mide como un indicador de actividad. Ver, por ejemplo, el Ejemplo 1.

## V. Esquema de flujo de trabajo

Las células CHO se transforman con los vectores que codifican las cadenas de un anticuerpo que se va a expresar y se cultivan para expresar el anticuerpo. La expresión generalmente se lleva a cabo inicialmente en un volumen de cultivo relativamente pequeño (por ejemplo, 1-50 L) con el fin de proporcionar anticuerpos suficientes para determinar un esquema de purificación. El medio de cultivo que contiene anticuerpos expresados posteriormente se somete a al menos una etapa de un esquema de purificación de anticuerpos para obtener un nivel de pureza adecuado para la conjugación química o el uso farmacéutico (por ejemplo, al menos 90, 95, 97, 98 o 99% p/p anticuerpo a contaminantes/impurezas macromoleculares). El esquema de purificación generalmente incluye al menos dos etapas de cromatografía en columna, al menos uno y generalmente etapas de filtración múltiples, una etapa de inactivación viral y una etapa de concentración y resuspensión/dilución. Después de completar una o todas las etapas de purificación, la preparación de anticuerpos se puede analizar para determinar la presencia de QSOX1. Si QSOX1 se detecta por encima del valor umbral de un ensayo de control negativo (más allá del error experimental) o se detecta por encima de un nivel considerado inaceptable para la conjugación posterior, se repite la purificación del cultivo inicial (u otro cultivo similar si hay una cantidad insuficiente del cultivo inicial disponible) con una segunda (o diferente) etapa y/o esquema de purificación. La segunda etapa y/o esquema de purificación puede diferir del primero en el tipo de purificación (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico versus catiónico, tipo de membrana utilizada para filtración) o los tampones utilizados para carga o elución, entre otras variaciones.

Después o durante la realización de la segunda etapa/esquema de purificación, la preparación de anticuerpos resultante se puede analizar para determinar QSOX1. Si QSOX1 se detecta por encima del valor umbral o por encima de un nivel determinado de otro modo como aceptable, posteriormente la purificación se realiza con un esquema de purificación adicional con o sin pruebas adicionales para la enzima QSOX1. Ya sea después del primer, segundo o posterior esquema de purificación, finalmente se obtiene una preparación de anticuerpo en la que QSOX1 no se detecta por encima del valor umbral o se detecta pero a un nivel considerado aceptable.

Una vez determinado un esquema de purificación que reduce QSOX1 más allá del límite de detección o al menos a un nivel aceptable, se realiza un segundo cultivo, a veces denominado cultivo de producción, de células CHO. El medio de cultivo se somete a una etapa/ esquema de purificación que ya se ha determinado que ha sido efectivo para purificar anticuerpos y eliminar QSOX1. El anticuerpo purificado resultante se reduce y posteriormente se conjuga con un agente, por ejemplo, un fármaco.

El segundo o cultivo de producción es típicamente más grande que el cultivo primario usado para determinar un esquema de purificación. Por ejemplo, el cultivo de producción puede ser al menos 100 o 1000 veces mayor en volumen que el cultivo primario. El cultivo de producción se realiza típicamente de forma repetida (cultivo por lote) o continuamente durante un período de al menos un año (por ejemplo, durante un período de al menos cinco años), como lo es la purificación del anticuerpo de ese cultivo mediante el esquema de purificación previamente determinado para purificar con éxito el anticuerpo sin QSOX1.

En un flujo de trabajo alternativo, el medio de cultivo de las células CHO está sujeto a un procedimiento de purificación de anticuerpos sin analizar necesariamente la enzima QSOX1, y la preparación purificada se somete a la conjugación química con un fármaco. Si la eficiencia de carga de conjugación (fármaco/anticuerpo medio) es inesperadamente baja (es decir, el número de moléculas de fármaco a anticuerpo es menor que la diana), posteriormente la preparación purificada se analiza para determinar la presencia de QSOX1. Si la enzima está presente por encima del nivel umbral o por encima de un nivel considerado aceptable, el anticuerpo se purifica del medio de cultivo de células CHO mediante un procedimiento de purificación diferente seguido de la prueba para la enzima QSOX1. La purificación por un procedimiento diferente seguido de la prueba de QSOX1 posteriormente se realiza, si es necesario de forma iterativa hasta hallar un procedimiento de purificación que purifique el anticuerpo de contaminantes/impurezas en general para proporcionar una pureza aceptable y elimine QSOX1 a un nivel umbral o nivel otro modo considerado aceptable para la conjugación. Cuando se halla tal procedimiento de purificación, se puede usar para preparar anticuerpos a partir de un segundo cultivo de células CHO. El anticuerpo purificado se conjuga posteriormente con un fármaco por medio de uno o más grupos sulfhidrilo libres.

## VI. Conjugación de anticuerpos a fármacos

Los anticuerpos se pueden conjugar con restos citotóxicos o citostáticos (que incluyen las sales farmacéuticamente compatibles de los mismos) para formar un conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC). Los anticuerpos se pueden conjugar con agentes distintos a los fármacos, por ejemplo, agentes de estabilidad (por ejemplo, restos de PEG). Los restos particularmente adecuados para la conjugación con anticuerpos son agentes citotóxicos (por ejemplo, quimiofármacos), enzimas convertidoras de profármacos, isótopos o compuestos radiactivos, o toxinas (estos restos se denominan colectivamente fármacos). Por ejemplo, un anticuerpo se puede conjugar con un agente citotóxico tal como un quimiofármaco o una toxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida tal como, por ejemplo, abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de la difteria).

Para los fines de la presente invención, los fármacos se conjugan con anticuerpos, por medio de grupos sulfhidrilo en el anticuerpo. Los grupos sulfhidrilo pueden ser grupos sulfhidrilo en cadenas laterales de cisteína. Los residuos de

cisteína pueden estar presentes de forma natural en un anticuerpo (por ejemplo, disulfuros intercatenarios) o introducir por otros medios, por ejemplo, mutagénesis. Los procedimientos de conjugación de fármacos con grupos de sulfhidrilo en anticuerpos son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, la Patente U.S. Núm. 7.659.241, 7.498.298 y la Publicación Internacional N° WO 2011/130613). Los anticuerpos se reducen antes de la conjugación para que los grupos sulfhidrilo estén disponibles para la conjugación. Los anticuerpos se pueden reducir usando condiciones conocidas en la técnica. Las condiciones reductoras son aquellas que generalmente no causan ninguna desnaturalización sustancial del anticuerpo y generalmente no afectan la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo. En un aspecto, el agente reductor utilizado en la etapa de reducción es TCEP (tris (2-carboxietil)fosfina) y el TCEP se añade en exceso durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por ejemplo, 250  $\mu$ l de una solución 10 mM de TCEP a pH 7,4 reducirán fácilmente los disulfuros intercatenarios de 1 a 100  $\mu$ g de anticuerpo en 30 minutos a temperatura ambiente. Sin embargo, se pueden usar otros agentes y condiciones reductoras. Los ejemplos de condiciones de reacción incluyen temperaturas de 5 ° C a 37 ° C en un intervalo de pH de 5 a 8. Los presentes inventores han descubierto que la oxidación de sulfhidrilos a disulfuros por una enzima oxidante tal como QSOX1 después de la reducción con un agente reductor puede producir grupos sulfhidrilo no disponibles para conjugación.

El fármaco se puede conjugar con el anticuerpo de manera de reducir su actividad a menos que se escinda del anticuerpo (por ejemplo, por hidrólisis, por degradación del anticuerpo o por un agente de escisión). Tal fármaco se une al anticuerpo con un ligando escindible que es sensible a la escisión en el ambiente intracelular de una célula diana pero no es sustancialmente sensible al ambiente extracelular, de modo que el fármaco se escinde del anticuerpo cuando el ADC es internalizado por la célula diana (por ejemplo, en el endosoma o, por ejemplo, en virtud de la sensibilidad al pH o la sensibilidad a la proteasa, en el ambiente lisosómico o en el ambiente caveolar).

Típicamente, el ADC comprende un ligando entre el fármaco y el anticuerpo. Como se señaló anteriormente, el ligando puede ser escindible en condiciones intracelulares, de modo que la escisión del ligando libera el fármaco del anticuerpo en el ambiente intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El ligando puede ser, por ejemplo, un ligando de peptidilo que se escinde mediante una peptidasa intracelular o enzima proteasa, que incluye una proteasa lisosómica o endosómica. Típicamente, el ligando de peptidilo tiene al menos dos aminoácidos de largo o al menos tres aminoácidos de largo. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina (ver, por ejemplo, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123). Los más típicos son los ligandos de peptidilo que se pueden escindir mediante enzimas que están presentes en las células diana. Por ejemplo, se puede usar un ligando de peptidilo que es escindible por la proteasa catepsina B dependiente de tior, que se expresa altamente en el tejido canceroso (por ejemplo, un ligando que comprende un péptido Phe-Leu o un péptido Gly-Phe-Leu-Gly ) Otros de estos ligandos se describen, por ejemplo, en el documento US 6.214.345. Un ejemplo de ligando de peptidilo escindible por una proteasa intracelular comprende un ligando Val-Cit o un dipéptido Phe-Lys (ver, por ejemplo, el documento US 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el ligando Val-Cit). Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del fármaco es que el agente normalmente se atenúa cuando se conjuga y la estabilidad sérica de los conjugados es típicamente alta.

El ligando escindible puede ser sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Típicamente, el ligando sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, se puede usar un ligando ácido-lábil que es hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal o similares). (Ver, por ejemplo, las patentes U.S. Nros. 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik and Walker, 1999, Pharm Therapeutics 83: 67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264: 14653-14661) Tales ligandos son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como las de la sangre, pero son inestables a un pH inferior a 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma.

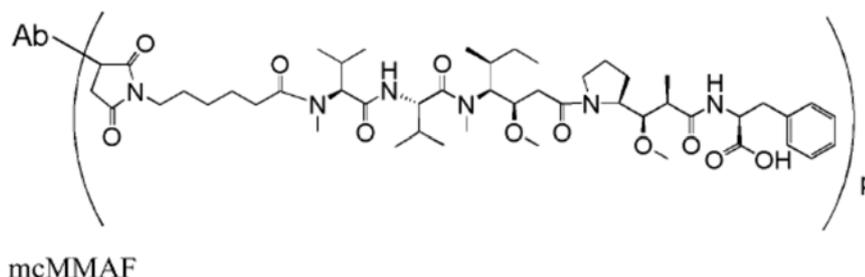
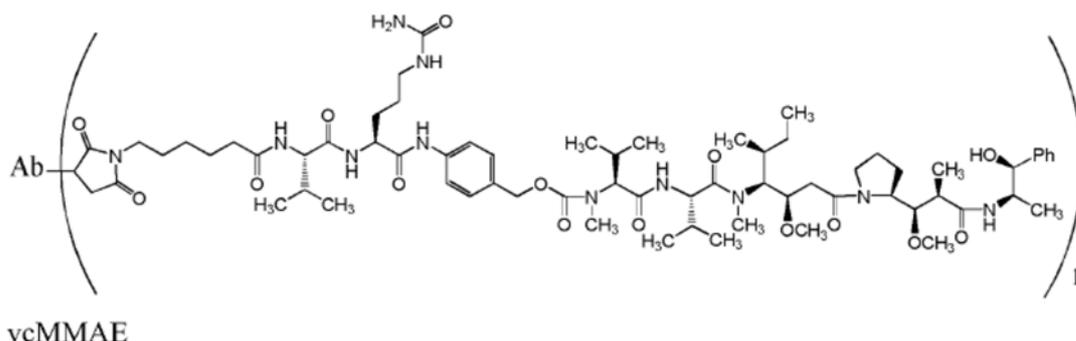
Otros ligandos son escindibles en condiciones reductoras (por ejemplo, un ligando disulfuro). Los ligandos de disulfuro incluyen los que se pueden formar usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfametil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno), SPDB y SMPT. (Ver, por ejemplo, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager y and Therapy of Cancer (CW Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Ver también la Patente U.S. Núm. 4.880.935.).

El ligando también puede ser un ligando de malonato (Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15: 1387-93), un ligando maleimidobenzilo (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3 (10): 1299-1304), o un análogo de 3'-N-amida (Lau et al., 1995, Bioorg-Med Chem. 3 (10): 1305-12).

El ligando también puede ser un ligando no escindible, tal como un ligando maleimido-alquileo o maleimida-arilo que se une directamente al fármaco (por ejemplo, un fármaco) y se libera por degradación del anticuerpo.

El ligando es uno que comprende un grupo funcional que es reactivo a un grupo presente en el anticuerpo. En algunos aspectos, el ligando está unido al anticuerpo a través de un enlace disulfuro entre un átomo de azufre del ligando y un átomo de azufre del anticuerpo. En otros aspectos, el ligando forma un enlace con un átomo de azufre del anticuerpo a través de un grupo maleimida del ligando. En algunos aspectos, el átomo de azufre proviene de un residuo de cisteína de un disulfuro intercatenario o de un residuo de cisteína introducido en el anticuerpo (por ejemplo, en la posición 239 de acuerdo con el índice EU).

- Las clases útiles de agentes citotóxicos para conjugar con anticuerpos incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, agentes de unión a surcos menores de ADN, inhibidores de la replicación de ADN, sensibilizadores de quimioterapia, dímeros de pirrolobenzodiacepina o similares. Otros ejemplos de clases de agentes citotóxicos incluyen antraciclinas, auristatinas, camptotecinas, duocarmicinas, etopósidos, maytansinoides y alcaloides de la vinca. Algunos ejemplos de
- 5 agentes citotóxicos incluyen auristatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), agentes de unión al surco menor de ADN (por ejemplo, enedíinas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, Paclitaxel y docetaxel), maytansinoides, benzodiacepinas (por ejemplo, pirrolo[1,4] benzodiacepinas, indolinobenzodiacepinas y oxazolidinobenzodiacepinas), alcaloides de la vinca, doxorubicina, morfolino-doxorrubicina y cianomorfolino-doxorrubicina.
- 10 El agente citotóxico puede ser un agente quimioterapéutico tal como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, melfalan, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. El agente también puede ser un análogo CC-1065, calicheamicina, maytansina, un análogo de dolastatina, rizoxina o palitoxina.
- El agente citotóxico también puede ser una auristatina. La auristatina puede ser un derivado de auristatina E es, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E puede reaccionar con ácido paraacetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y la estructura de varias auristatinas se describen, por ejemplo, en los documentos
- 15 US 2005-0238649 y US2006-0074008.
- El agente citotóxico puede ser un agente de unión al surco menor de ADN. (Ver, por ejemplo, el documento US 6.130.237.) Por ejemplo, el agente de unión al surco menor puede ser un compuesto de CBI o un enedíina (por
- 20 ejemplo, calicheamicina).
- El agente citotóxico o citostático puede ser un agente anti-tubulina. Los ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alquiloides de vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina) y auristatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina adecuados incluyen, por ejemplo, derivados de baccatina, análogos de taxanos
- 25 (por ejemplo, epotilón A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maytansinoides, combretastatinas, discodermolida y eleuterobina.
- El agente citotóxico puede ser un maytansinoide, otro grupo de agentes anti-tubulina. Por ejemplo, el maytansinoide puede ser maytansina o un ligando de fármacos que contiene maytansina tal como DM-1 o DM-4 (ImmunoGen, Inc. ; ver también Chari et al., 1992, Cancer Res. 52: 127-131).
- 30 Los ejemplos de conjugados de fármaco y anticuerpo incluyen conjugados de fármaco y anticuerpo vcMMAE y mcMMAF como sigue en los que p representa la carga de fármaco y varía de 1 a 20 y Ab es un antibiótico.



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

VII. Procedimientos de purificación del anticuerpo

Se conoce un gran repertorio de técnicas para la purificación de proteínas del sobrenadante de CHO. Estas técnicas incluyen centrifugación, filtración, precipitación, inactivación viral y numerosos tipos de cromatografía en columna que incluyen proteína-A, proteína-G, proteína-L, intercambio aniónico, intercambio catiónico, modo mixto, hidroxapatita, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de afinidad por la diana. Las etapas de cromatografía generalmente emplean al menos dos tampones, uno para carga y otro para elución. Los tampones pueden variar en pH y fuerza iónica, entre otros factores. Un ejemplo de purificación de anticuerpos incluye al menos una etapa de filtración, al menos una etapa de inactivación viral, una columna de proteína A y al menos otra columna. Debido a la cantidad de diferentes técnicas y posibilidades para tampones, pH y otros excipientes en las soluciones de carga y elución, el número de diferentes procedimientos de purificación es muy grande. Por lo tanto, los procedimientos de purificación adecuados para diferentes anticuerpos a menudo se determinan empíricamente para identificar un procedimiento que purifique el anticuerpo a un nivel aceptable para uso farmacéutico (determinado por la relación de anticuerpo a contaminantes/impurezas macromoleculares en general) y en el que QSOX1 y/o otras enzimas oxidantes de células CHO se reducen por debajo de un nivel detectable o al menos a un nivel aceptable.

La precipitación con sulfato de amonio se puede usar para enriquecer y concentrar anticuerpos del suero, fluido ascítico o sobrenadante de cultivo celular. A medida que aumenta la concentración de esta sal liotrópica en una muestra, las proteínas y otras macromoléculas se vuelven progresivamente menos solubles hasta que precipitan. Los anticuerpos precipitan a concentraciones más bajas de sulfato de amonio que la mayoría de las otras proteínas y componentes del suero. La selectividad, rendimiento, pureza y reproducibilidad de la precipitación depende de varios factores, que incluyen tiempo, temperatura, pH y contenido de sal.

Los contaminantes celulares de los anticuerpos pueden flocular usando polielectrolitos ácidos o catiónicos. Los polielectrolitos normalmente actúan mediante la adsorción de una partícula para crear un parche con carga opuesta en la superficie. Este parche posteriormente se puede adherir a un parche desnudo en una superficie de partículas opuestas debido a la atracción electrostática.

Los filtros de profundidad se pueden utilizar para clarificar los caldos de cultivo celular, para mantener la capacidad en los filtros de membrana o para proteger las columnas de cromatografía o los filtros de virus. Los filtros de profundidad están hechos típicamente de celulosa, un auxiliar de filtración poroso tales como la tierra de diatomeas y un agente de unión de resina con carga iónica. Los filtros de profundidad pueden emplear tanto la exclusión por tamaño como la unión adsorbente para efectuar la separación.

La cromatografía de membrana o los adsorbentes de membrana actúan de manera similar a las columnas de cromatografía empaquetadas, pero en el formato de los módulos de filtración convencionales. La cromatografía de membrana utiliza membranas microporosas, generalmente en múltiples capas que contienen ligandos funcionales unidos a la superficie interna de los poros en toda la estructura de la membrana. Las membranas Q disponibles comercialmente incluyen ChromaSorb™ (Millipore), Mustang® (Pall) y Sartobind® (Sartorius). Alrededor de pH neutro a ligeramente básico y con conductividades bajas, virus, ADN, endotoxina, una gran población de proteínas de la célula huésped y proteína A lixiviada se unen a la membrana Q, mientras que las moléculas de anticuerpo típicamente básicas fluyen a través de la matriz de la membrana sin unirse.

La ultrafiltración es un proceso de membrana impulsado por presión que se usa ampliamente para la concentración de anticuerpos y el intercambio de tampones. La ultrafiltración es una separación basada en el tamaño en la que se retienen especies más grandes que los poros de la membrana y las especies más pequeñas pasan libremente. La separación en la ultrafiltración se logra a través de diferencias en las tasas de filtración de diferentes componentes a través de la membrana bajo una fuerza impulsora de presión dada. El intercambio de tampón se logra usando un modo de diafiltración en el que el tampón de la composición final deseada se añade al sistema de retención a la misma tasa en la que se elimina el filtrado, de este modo se mantiene un volumen de la fracción retenida constante. La ultrafiltración con poros de membrana que varían de 1 a 20 nm puede proporcionar la separación de especies que varían en peso molecular de 500 daltons a 1.000 kilodaltons.

La filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (HPTFF) es una operación de unidad bidimensional en la que se utilizan tanto las diferencias de tamaño como de carga con el propósito de purificación y separación. La concentración de proteínas y el intercambio de tampones se pueden lograr en la misma operación de la unidad.

Los virus se pueden inactivar mediante tratamiento a pH bajo y/o eliminar mediante diversos procedimientos, que incluyen filtración. Los filtros que retienen virus actuales son ultrafiltros o microfiltros con poros muy pequeños. Las membranas de filtración de virus están hechas de polietersulfona hidrófila (PES), difluoruro de polivinilideno hidrófilo (PVDF) y celulosa regenerada.

La cromatografía de intercambio iónico utiliza resinas cargadas positiva o negativamente para unir proteínas en función de sus cargas netas en un sistema tampón determinado. Se pueden determinar condiciones (por ejemplo, pH y fuerza iónica) que unan y liberen el anticuerpo diana con un alto grado de especificidad. Por el contrario, se pueden encontrar

condiciones que permiten unir a casi todos los demás componentes de la muestra, excepto los anticuerpos. La cromatografía de intercambio aniónico utiliza un grupo cargado positivamente, que puede ser débilmente básico, tal como dietilamino etilo (DEAE) o dimetilamino etilo (DMAE), o fuertemente básico, tal como trimetilamonio etilo (TMAE) o aminoetilo cuaternario (QAE).

- 5 La cromatografía de intercambio catiónico utiliza una resina modificada con grupos funcionales cargados negativamente. Las cromatografías catiónicas y aniónicas son técnicas complementarias: las moléculas que se unen fuertemente a una, se unen débilmente, si acaso, a la otra.

Las columnas de intercambio de cationes pueden ser ligandos ácidos fuertes tales como grupos sulfopropilo, sulfoetilo y sulfoisobutilo o ligando ácido débil tal como grupo carboxilo. La cromatografía de intercambio catiónico se ha aplicado para procesos de purificación de muchos mAbs con valores de pI que varían desde aproximadamente neutro o un poco por debajo (por ejemplo, aproximadamente 6) hasta básico. La mayoría de las subclases de IgG1 e IgG2 humanizadas son buenas candidatas para la cromatografía de intercambio catiónico, en la que el anticuerpo se une a la resina durante la etapa de carga y se eluye aumentando la conductividad o aumentando el pH en el tampón de elución. Las impurezas relacionadas con el proceso con carga negativa tal como el ADN, algunas proteínas de la célula huésped, la proteína A lixiviada y la endotoxina se eliminan en la fracción de carga y lavado. La cromatografía de intercambio catiónico también puede separar productos desamidados, especies oxidadas y formas truncadas N-terminales, así como especies de alto peso molecular del anticuerpo deseado. La unión de los anticuerpos a las resinas de intercambio catiónico depende del pH y la conductividad, y del tipo de resina. SP Sepharose FF y SP Sepharose XL son dos resinas comunes disponibles en el comercio.

20 La cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) es una herramienta útil para separar proteínas en función de su hidrofobicidad, y es complementaria con otras técnicas que separan proteínas en función de la carga, tamaño o afinidad. La muestra se carga típicamente en la columna HIC en un tampón con alto contenido de sal. La sal en el tampón interactúa con las moléculas de agua para reducir la solvatación de las moléculas de proteína en solución, de este modo se exponen las regiones hidrófobas en las moléculas de proteína de muestra que, en consecuencia, se unen a la resina HIC. Cuanto más hidrófoba es la molécula, menos sal se necesita para promover la unión.

La cromatografía de quelato metálico inmovilizado utiliza iones metálicos divalentes inmovilizados con quelato (por ejemplo, cobre, cobalto o níquel) para unir proteínas o péptidos que contienen grupos de tres o más residuos de histidina consecutivos. La estrategia se usa con mayor frecuencia para purificar proteínas recombinantes que se han manipulado genéticamente para contener una etiqueta de fusión 6xHis terminal. Las IgG son una de las pocas proteínas abundantes en el suero (o sobrenadante de cultivo celular de hibridoma monoclonal) que poseen grupos de histidina capaces de unirse con níquel inmovilizado. Las condiciones de unión y elución se pueden optimizar para muestras particulares para proporcionar una purificación de anticuerpos suave y confiable.

La proteína A, proteína G y proteína L, que incluyen sus versiones recombinantes, son ejemplos de proteínas utilizadas habitualmente para la purificación por afinidad de tipos de anticuerpos clave a partir de una variedad de especies. La cromatografía de proteína A generalmente implica el pasaje de un sobrenadante de cultivo celular clarificado sobre la columna a pH 6-8, en tales condiciones los anticuerpos se unen y los componentes no deseados tales como las proteínas de la célula huésped y los componentes del medio de cultivo celular y los virus fluyen a través de la columna. Se puede llevar a cabo una etapa de lavado intermedio opcional para eliminar las impurezas unidas de forma no específica de la columna, seguido de elución del producto a pH 2,5-4. Actualmente hay tres tipos principales de resinas de proteína A, clasificadas en función de su composición del esqueleto de resina: vidrio o sílice, por ejemplo, Prosep vA, Prosep vA Ultra (Millipore); a base de agarosa, por ejemplo, Proteína A Sepharose Fast Flow, MabSelect (GE Healthcare); y a base de polímeros orgánicos, por ejemplo, poliestireno-divinilbenceno Poros A y MabCapture (Applied Biosystems). Se pueden usar varios componentes del tampón de elución, tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, arginina HCl y glicina HCl, de acuerdo con el anticuerpo. La selección del pH de elución también depende de la afinidad de unión del anticuerpo a la resina, los anticuerpos con una afinidad de unión más alta requieren un pH de elución más bajo.

La hidroxiapatita cerámica  $(Ca_5(PO_4)_3OH)_2$  es una forma de fosfato de calcio que se puede usar a menudo con una elución de gradiente de fosfato de sodio para separar anticuerpos de dímeros, agregados y proteína A lixiviada entre otros contaminantes.

- 50 Las técnicas para eliminar QSOX1, en particular, se describen en la presente y en la sección de Ejemplos y se pueden usar además de, o en combinación con, cualquiera de los procedimientos anteriores.

#### VIII. Ejemplos de anticuerpos

Los procedimientos de purificación y los flujos de trabajo descritos se pueden usar para cualquier anticuerpo, que incluyen los no humanos, humanizados, humanos, quiméricos, revestidos, nanocuerpos, dAbs, scFV, Fabs y similares. Los presentes procedimientos son más útiles para que los anticuerpos se conjuguen con un agente para uso diagnóstico o terapéutico. Por ejemplo, los procedimientos son útiles para que los anticuerpos se conjuguen con un fármaco para uso terapéutico. Algunos de estos anticuerpos son inmuno-específicos para un antígeno de células

cancerosas, preferiblemente uno en la superficie celular internalizable dentro de una célula en la unión al anticuerpo. Las dianas a las que se pueden dirigir los anticuerpos incluyen receptores en las células cancerosas y sus ligandos o contrarreceptores (por ejemplo, CD3, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD40, CD44, CD52, CD70, CD79a, Her-2, VEGF o VEGFR, CTLA-4, LIV-1 y nectina-4).

- 5 Los presentes procedimientos también son útiles para purificar anticuerpos que se usarán para obtener ADC para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad autoinmune.

Los presentes procedimientos también son útiles para purificar anticuerpos que se unen a un receptor o un complejo de receptor expresado en un linfocito activado.

- 10 Los presentes procedimientos también son útiles para purificar anticuerpos específicos para un antígeno viral o microbiano.

- 15 Algunos ejemplos de anticuerpos comerciales y sus dianas adecuadas para la aplicación de los presentes procedimientos incluyen alemtuzumab, CD52, rituximab, CD20, trastuzumab Her/neu, nimotuzumab, cetuximab, EGFR, bevacizumab, VEGF, palivizumab, RSV, abciximab, GpIIb/IIIa, infliximab, adalimumab, certolizumab, golimumab TNF-alfa, baciliximab, daclizumab, IL-2, omalizumab, IgE, gemtuzumab, CD33, natalizumab, VLA-4, vedolizumab alpha4beta7, belimumab, BAFF, orelizumab, teplizumab CD3, de atumumab, ocrelizumab CD20, epratuzumab CD22, alemtuzumab CD52, eculizumab C5, canakinumab IL-1 beta, mepolizumab IL-5, reslizumab, tocilizumab IL-6R, ustekinumab, y briakinumab IL-12. Opcionalmente, el anticuerpo no es brentuximab.

#### IX. Procedimientos de tratamiento y composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación

- 20 Los ADC producidos de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente se administran en un régimen efectivo que significa una dosis, vía de administración y frecuencia de administración que retrasa el inicio, reduce la gravedad, inhibe el deterioro adicional y/o mejora al menos un signo o síntoma de la enfermedad que se desea tratar, tal como cáncer, enfermedad autoinmune o infección, incluida cualquiera de las indicaciones discutidas anteriormente. Si un paciente ya padece la enfermedad, el régimen se puede denominar un régimen terapéuticamente efectivo. Si el paciente tiene un riesgo elevado de la enfermedad en relación con la población general pero aún no experimenta síntomas, el régimen se puede denominar un régimen profilácticamente efectivo. En algunos casos, la eficacia terapéutica o profiláctica se puede observar en un paciente individual en relación con los controles históricos o la experiencia pasada en el mismo paciente. En otros casos, la eficacia terapéutica o profiláctica se puede demostrar en un ensayo preclínico o clínico en una población de pacientes tratados en relación con una población de control de pacientes no tratados.

- 35 Las dosis para un ADC generalmente varían de acuerdo con el componente farmacológico del ADC. Los ejemplos de dosis pueden incluir, por ejemplo, de 1,0 µg/kg a 7,5 mg/kg, o 2 mg/kg a 7,5 mg/kg o 3 mg/kg a 7,5 mg/kg del peso corporal del sujeto, o 0,1-20, o 0,5-5 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg) o 10-1500 o 200-1500 mg como dosis fija. En algunos procedimientos, se administra al paciente una dosis de al menos 1,5 mg/kg, al menos 2 mg/kg o al menos 3 mg/kg, administrada una vez cada tres semanas o más. La dosis depende de la frecuencia de administración, el estado del paciente y la respuesta al tratamiento previo, si corresponde, si el tratamiento es profiláctico o terapéutico y si el trastorno es agudo o crónico, entre otros factores.

- 40 La administración puede ser parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. La administración también se puede localizar directamente, tal como en un tumor. Se prefiere la administración a la circulación sistémica por administración intravenosa o subcutánea. La administración intravenosa puede ser, por ejemplo, por infusión durante un período tal como 30-90 min o por una inyección en bolo única.

- 45 La frecuencia de administración depende de la vida media del ADC en la circulación, la afección del paciente y la vía de administración, entre otros factores. La frecuencia puede ser diaria, semanal, mensual, trimestral o a intervalos irregulares en respuesta a los cambios en la condición del paciente o la progresión del cáncer que se está tratando. Un ejemplo de frecuencia para la administración intravenosa es entre dos veces por semana y trimestralmente durante un curso continuo de tratamiento, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente. Otros ejemplos de frecuencias para la administración intravenosa son entre semanal o tres de cada cuatro semanas durante un curso continuo de tratamiento, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente. Para la administración subcutánea, un ejemplo de frecuencia de dosificación es diaria o mensual, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente.

- 55 El número de dosis administradas depende de la naturaleza de la enfermedad (por ejemplo, si presenta síntomas agudos o crónicos) y la respuesta del trastorno al tratamiento. Para trastornos agudos o exacerbaciones agudas de un trastorno crónico, a menudo son suficientes entre 1 y 10 dosis. A veces, una dosis de bolo única, opcionalmente en forma dividida, es suficiente para un trastorno agudo o exacerbación aguda de un trastorno crónico. El tratamiento se puede repetir para la recurrencia de un trastorno agudo o exacerbación aguda. Para los trastornos crónicos, se

puede administrar un anticuerpo a intervalos regulares, por ejemplo, semanal, quincenal, mensual, trimestral, cada seis meses durante al menos 1, 5 o 10 años, o la vida del paciente.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son preferiblemente estériles y sustancialmente isotónicas (240-360 mOsm/kg) y se fabrican en condiciones de GMP. Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en forma de dosis unitaria (es decir, la dosis para una única administración). Las composiciones farmacéuticas se pueden formular usando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables. La formulación depende de la vía de administración elegida. Para la inyección, los ADC se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como la solución de Hank, solución de Ringer o solución salina fisiológica o tampón de acetato (para reducir la incomodidad en el sitio de la inyección). La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, los anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de su uso. La concentración de anticuerpo en una formulación líquida puede ser, por ejemplo, 1-100 mg/ml, tal como 10 mg/ml.

El tratamiento con ADC de la invención se puede combinar con quimioterapia, radiación, tratamiento con células madre, cirugía, antivirales, antibióticos, inmunosupresores o estimulantes, u otros tratamientos efectivos contra el trastorno que se está tratando. Las clases útiles de otros agentes que se pueden administrar con ADC para el tratamiento de cánceres o enfermedades autoinmunes incluyen, por ejemplo, anticuerpos contra otros receptores expresados en células cancerosas, agentes antitubulina (por ejemplo, auristatinas), agentes de unión del surco menor de ADN, inhibidores de replicación de ADN, agentes de alquilación (por ejemplo, complejos de platino tales como cisplatino, mono (platino), bis (platino) y complejos de platino trinucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos preformados, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores a la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides de la vinca y similares.

En algunos aspectos, el tratamiento con los ADC puede aumentar la supervivencia media libre de progresión o el tiempo de supervivencia total de los pacientes con tumores, especialmente cuando recaen o son refractarios, en al menos 30% o 40%, pero preferiblemente 50%, 60% a 70% o incluso 100% o más, en comparación con el mismo tratamiento (por ejemplo, quimioterapia) pero sin un ADC. En algunos aspectos, el tratamiento (por ejemplo, quimioterapia estándar) puede aumentar la tasa de respuesta completa, tasa de respuesta parcial o la tasa de respuesta objetiva (completa + parcial) de pacientes con tumores en al menos 30% o 40%, pero preferiblemente 50%, 60% al 70% o incluso al 100% en comparación con el mismo tratamiento (por ejemplo, quimioterapia) pero sin el ADC.

Normalmente, en un ensayo clínico (por ejemplo, un ensayo de fase II, fase II/III o fase III), los aumentos mencionados anteriormente en la supervivencia libre de progresión media y/o tasa de respuesta de los pacientes tratados con terapia estándar más el ADC, con respecto al grupo de control de pacientes que reciben terapia estándar sola (o más placebo), son estadísticamente significativos, por ejemplo en el nivel  $p = 0,05$  o  $0,01$  o incluso  $0,001$ . Las tasas de respuesta completa y parcial se determinan mediante criterios objetivos comúnmente utilizados en ensayos clínicos para el cáncer, por ejemplo, según lo enumerado o aceptado por el Instituto Nacional del Cáncer y/o la Administración de Alimentos y Medicamentos.

## Ejemplos

### **Ejemplo 1: Evidencia de que QSOX1 está presente en preparaciones de anticuerpos purificadas de cultivos de células CHO**

El lote DEVNKB-1, que resultó de la purificación de un anticuerpo expresado en células CHO, exhibió inesperadamente mala conjugación de fármacos. En contraste, el lote L22042/E exhibió el nivel deseable de conjugación de fármacos. Debido a que la conjugación del fármaco con el anticuerpo está mediada por grupos sulfhidrilo libres, se sospechó la presencia de una impureza que tiene actividad oxidante en el lote DEVNKB-1. La Figura 1 muestra el impacto de la impureza oxidante sobre la eficacia de la conjugación del fármaco con el anticuerpo. El anticuerpo del lote DEVNKB-1 (símbolos de rombo) muestra una carga de fármaco reducida a medida que el tiempo de reducción aumenta en 50 minutos, mientras que el anticuerpo del lote L22042/E (símbolos cuadrados) muestra un nivel constante y esperado de carga de fármaco en el transcurso de reducción.

Debido a que se ha observado que ciertas preparaciones de otros anticuerpos producidos en células CHO tienen una actividad oxidante similar a la del lote DEVNKB-1, la fuente de la actividad oxidante fue un tema de interés. Para determinar la fuente de la actividad oxidante, se analizó el lote DEVNKB-1 para determinar la presencia de una sulfhidril oxidasa mediante electroforesis en gel y transferencia Western, y cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

### Electroforesis en gel y transferencia Western

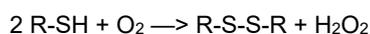
La comparación de los lotes DEVNKB-1 y L22042/E después de la separación por SDS-PAGE y la tinción con plata no reveló ninguna banda de proteína obviamente correspondiente a la actividad oxidante (datos no mostrados). Para lograr una mejor resolución, el lote DEVNKB-1 se fraccionó por cromatografía de exclusión por tamaño. Las fracciones se analizaron para determinar la actividad oxidante como se describe en el ejemplo 2. Ver Figura 2a. Las fracciones correspondientes a la actividad pico se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron, posteriormente se tiñeron con anticuerpos contra proteínas de sulfhidril oxidasa candidatas, que incluyen QSOX1, QSOX2 y ALR (aumentador de la regeneración hepática). Las Figuras 2b y 2c muestran los resultados del análisis de transferencia Western usando anticuerpos primarios anti-ALR y anti-QSOX1, respectivamente, seguidos de un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra de conejo. Las transferencias revelaron una reactividad cruzada extensa entre el anticuerpo secundario y muchas especies relacionadas con el producto. Sin embargo, se detectó una banda en las fracciones de actividad pico 27-29 correspondientes a un peso molecular entre 65kD y 70kD en la transferencia anti-QSOX1 (Figura 2c), que es compatible con el peso predicho de QSOX1 de hámster (70.356 Daltons).

#### Análisis LC-MS/MS

Para identificar la proteína de 65-70 kD detectada en la transferencia Western anti-QSOX1, el lote DEVNKB-1 se fraccionó por cromatografía de afinidad en una columna de proteína A de Poros. Ver Figura 3a. Las fracciones se analizaron para determinar la actividad oxidante como se describe en el ejemplo 2. Ver Figura 3b. Esencialmente, toda la actividad oxidante salió en las fracciones 3 y 4. Las fracciones 3 y 4 de una serie de tres corridas se agruparon y analizaron mediante SDS-PAGE. Ver Figura 3c. La banda más prominente estaba en el intervalo de 65-70kD y formó una banda única difusa o doblete, compatible con la transferencia Western. Usando la digestión en gel y LC-MS/MS, la banda se identificó positivamente como QSOX1.

#### Caracterización del agente oxidante

Además, para caracterizar la actividad oxidante en el lote DEVNKB-1, se analizó la actividad oxidante de sulfhidrilo en el lote utilizando el ensayo de oxidación ferrosa de naranja de xilenol (FOX). Las sulfhidril oxidasas catalizan la siguiente reacción:



A medida que avanza la reacción, se consume oxígeno y se produce peróxido de hidrógeno. El subproducto de peróxido de hidrógeno se puede detectar de manera fácil y confiable, y por lo tanto sirve como un sustituto de la actividad sulfhidrilo oxidasa. En el ensayo FOX, el peróxido de hidrógeno oxida el hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) para producir hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Posteriormente, el hierro ferroso forma complejos con naranja de xilenol para formar un compuesto que absorbe a luz 560 nm. Por lo tanto, al controlar la absorción de luz de 560 nm (por ejemplo, usando un espectrofotómetro), se puede determinar la cantidad de actividad oxidante de sulfhidrilo en una muestra. El valor de un control negativo se compara con el valor de la muestra de prueba mediante la determinación de la diferencia en la lectura de 560 nm. Si el valor resultante es mayor que 0,1 unidades de absorbancia, entonces la muestra es positiva para la impureza oxidante. Como se muestra en la Tabla 1, la presencia de DEVNKB-1 dio como resultado una absorción de 560 nm de 0,70-0,80. Sin embargo, la adición de DEVNKB-1 y  $\text{Zn}^{2+}$  1 mM fue de solo 0,008. Los datos muestran que  $\text{Zn}^{2+}$  1 mM puede eliminar esencialmente la actividad oxidante en el lote DEVNKB-1. Esto es compatible con el agente oxidante que tiene un dominio de sulfhidrilo oxidasa dependiente de flavina, tal como QSOX1.

40

**Tabla 1**

Aditivo	DEVNKB-1		Diferencia	% Actividad
	+	-		
-	0,81047	1,53920	0,72873	100%
-	0,80907	1,58360	0,77453	
$\text{Zn}^{2+}$ 1 mM	1,48020	1,48810	0,00790	1 %

Se realizaron ensayos adicionales para ver si EDTA podría revertir la eliminación dependiente de  $\text{Zn}^{2+}$  de la actividad oxidante en el lote DEVNKB-1. En estos experimentos, se añadió  $\text{Zn}^{2+}$  al tampón de ensayo, con o sin EDTA. Además, se evaluó el tampón de ensayo que tiene EDTA. Como se muestra en la Tabla 2, la actividad oxidante asociada con el lote DEVNKB-1 se redujo en un 95% por la presencia de  $\text{Zn}^{2+}$  en relación con el tampón de ensayo que contenía EDTA adicional. Sin embargo, la adición de  $\text{Zn}^{2+}$  y EDTA adicional redujo la actividad oxidante en solo 6%. Por lo tanto, el EDTA revirtió efectivamente la inhibición de la actividad oxidante dependiente de  $\text{Zn}^{2+}$ . Nuevamente, esto es lo que se espera de un agente oxidante que tiene un dominio de sulfhidrilo oxidasa dependiente de flavina, tal como QSOX1.

45

Tabla 2

Aditivo	DEVNKB-1		Diferencia	% Actividad
	+	-		
Zn <sup>2+</sup> 1 mM	1,50550	1,53647	0,03097	5%
Zn <sup>2+</sup> 1 mM + EDTA	0,99833	1,53647	0,53814	94%
EDTA	0,96444	1,53647	0,57203	100%

Sobre la base de los datos de la transferencia Western, los datos de LC-MS/MS (no mostrados) y la caracterización de la actividad oxidante, se determinó que la actividad oxidante en el lote DEVNKB-1 es la sulfhidrido oxidasa QSOX1.

5

### **Ejemplo 2: Ensayos para detectar QSOX1 en cultivos de células CHO**

Para proporcionar la detección de la actividad oxidante en las preparaciones de anticuerpos (por ejemplo, cuando el anticuerpo está destinado a la conjugación con un fármaco), se desarrolló un ensayo que utiliza SGN-30 parcialmente reducido (anticuerpo cAC10, que es el componente de anticuerpo de brentuximab vedotina como sustrato. SGN-30 se seleccionó como sustrato porque el anticuerpo cAC10 se ha purificado consistentemente sin contaminación QSOX1. Se pueden usar otros sustratos bien caracterizados que tienen tioles libres en lugar de SGN-30.

10

El ensayo implica incubar el sustrato (por ejemplo, SGN-30) con una muestra de prueba durante una cantidad fija de tiempo, posteriormente detectar la cantidad de grupos sulfhidrido libres en el sustrato usando DTNB (5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzoico), también conocido como reactivo de Ellmans).

15



Los grupos tiol libres en el sustrato reaccionan con DTNB, escinden el enlace disulfuro y producen 2-nitro-5-tiobenzoato (NTB<sup>-</sup>), que se ioniza a NTB<sup>2-</sup> en agua a pH neutro y alcalino. NTB<sup>2-</sup> tiene un color amarillo y se puede cuantificar rápidamente usando un espectrofotómetro y midiendo la absorbancia de la luz visible a 412 nm. Si las impurezas oxidantes están presentes en la muestra de prueba, los grupos sulfhidrido libres en el sustrato (por ejemplo, en los residuos de cisteína que no están involucrados en un enlace disulfuro) se oxidan en enlaces disulfuro, lo que produce menos tioles libres. Por lo tanto, hay menos reacción entre el sustrato y el DTNB, lo que da como resultado una menor producción de color amarillo y una absorción correspondientemente menor de luz 412 nm por la muestra.

20

La reacción entre DTNB y los grupos tiol libres es rápida y estequiométrica. Por consiguiente, si se desea, la cantidad de grupos sulfhidrido libres en el sustrato se puede cuantificar usando un coeficiente de extinción molar de 14,150 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (adecuado para soluciones tampón diluidas).

25

Los materiales utilizados en el ensayo incluyen espectrofotómetro (por ejemplo, modelo 8453 de Agilent); Cubeta de cuarzo (por ejemplo, Starna, 16,50-Q-10/Z15); Tris HCl 1 M, pH 7,4; EDTA 0,5 M, pH 8,0; fosfato de potasio monobásico; fosfato de potasio dibásico; polisorbato 80; DTNB (por ejemplo, Sigma D218200).

30

El ensayo implica el análisis espectrofotométrico de al menos una muestra de control negativo, un control positivo, una muestra de prueba y un blanco de espectrofotómetro. Se pueden analizar muestras adicionales de control y/o prueba según sea necesario. La composición de las muestras de control y prueba es como se muestra en la Tabla 3. El tampón usado en el ensayo es fosfato de potasio 10 mM, Polisorbato 80 0,2 mg/ml, pH 6,0. Sin embargo, otros tampones diluidos también son adecuados de acuerdo con el tampón de la muestra de prueba para analizar. El volumen final de las muestras es para analizar en 150 µl, pero que también se puede ajustar según sea necesario. Para simplificar el ensayo, se puede preparar un cóctel de mezcla maestra que contiene el tampón, EDTA, agua y sustrato (por ejemplo, CAC10 parcialmente reducido), el ensayo se inicia tras la adición de 50 µl de muestra a 100 µl de cóctel de mezcla maestra.

35

Tabla 3

	Tris 1 M, pH 7,4	EDTA 0,5M pH 8,0	Agua	cAC10 parcialmente reducido	Muestra
Control negativo	15,0 µl	3,0 µl	7,0 µl	75,0 µl	50,0 µl Tampón
Control positivo	15,0 µl	3,0 µl	7,0 µl	75,0 µl	50,0 µl REFNKB-1
Muestra de prueba	15,0 µl	3,0 µl	7,0 µl	75,0 µl	50,0 µl de muestra de prueba
Blanco espectrómetro	75,0 µl	15,0 µl	35,0 µl	625,0 µl Tampón	

La preparación y el análisis de la muestra se realizan de la siguiente manera. Los tubos de microcentrifuga se rotulan en correspondencia con las muestras y controles para analizar. Se colocan 100 µl de cóctel de mezcla maestra en cada tubo. Se añaden 50 µl de cada muestra al tubo de muestra de control/prueba correspondiente. Los tubos se mezclan por agitación en vórtex. Los tubos se colocan en un baño de agua a 37 ° C o en una incubadora y se incuban durante 2 horas. Se rotula un segundo tubo de microcentrifuga para cada muestra y se colocan 100 µl de DTNB 1 mM en cada tubo. Al final de las 2 h de incubación, las muestras se retiran del baño de agua/incubadora y se transfieren 100 µl de muestra al tubo de microcentrifuga correspondiente que contiene 100 µl de DTNB. Los tubos se mezclan por agitación en vórtex. Las muestras se incuban a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos, posteriormente se determina la absorbancia. La absorbancia se mide a 412 nm y se corrige para absorbancia a 700 nm (es decir, determinación A412-A700). Los espectros se pueden recoger de 200 a 700 nm.

Para evaluar la presencia de una impureza oxidante en una muestra de prueba, el valor (412 nm-700 nm) del control negativo (Tampón) se compara con el valor de la muestra de prueba mediante la determinación de la diferencia en la lectura de 412nm. Si el valor resultante es mayor que 0,1 unidades de absorbancia, entonces la muestra es positiva para la impureza oxidante.

Cuando se analiza el medio de cultivo a partir de un cultivo de anticuerpos, el ensayo típicamente produce valores altos (~0,5 AU), lo que sugiere altos niveles de oxidante. Sin embargo, la lectura del ensayo se basa en el color y el color en el medio de cultivo celular tiende a interferir en la lectura del ensayo. En consecuencia, es difícil medir definitivamente la impureza oxidante en la cosecha clarificada usando este ensayo. La impureza oxidante se mide preferiblemente después de al menos una etapa de purificación, por ejemplo, después de al menos una etapa de cromatografía (por ejemplo, después de la cromatografía de proteína A, intercambio iónico o HIC).

Este ensayo mide la actividad de la sulfhidril oxidasa en general, incluida la actividad que surge de QSOX1, QSOX2, ALR y otras enzimas. También se pueden usar ensayos más específicos para sulfhidril oxidasas específicas, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1.

### **Ejemplo 3: Procedimientos para eliminar QSOX1**

#### **Reducción de la impureza oxidante mediante la implementación de un lavado de sal en la proteína A**

Se encontró que una preparación de un segundo anticuerpo denominado en la presente como Anticuerpo 2 tiene niveles inaceptablemente altos de actividad oxidante (después de la clarificación por medio de centrifugación y filtración). Para eliminar la impureza oxidante, se evaluó la cromatografía de proteína A con lavados con sales de concentración variable.

Una columna MabSelect Sure Proteína A de 3,2 cm de diámetro por 23,2 cm de altura (193,2 ml de volumen de lecho) se equilibró con Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5 y posteriormente se cargó a 25 g de mAb/L de lecho empaquetado. Después de cargar, la columna se lavó con soluciones tamponadas con Tris 50 mM que contienen diversos niveles de NaCl, como se muestra en la Tabla 4. La elución de anticuerpos se realizó usando acetato 25 mM pH 3,4. El caudal de flujo se mantuvo constante a los 4 minutos de tiempo de residencia.

El nivel de impureza oxidante en eluatos de columna se analizó usando el ensayo del Ejemplo 2. Los datos (ver la Tabla 4) muestran que la impureza oxidante no estaba contenida en el eluato de proteína A cuando se lavó con una concentración de sal moderada (NaCl 150 mM) o alta (NaCl 500 mM). Un lavado que contiene una baja concentración de sal (NaCl 50 mM) fue ineficaz para reducir el nivel de impureza oxidante por debajo del umbral de absorbancia de 0,1. El lavado de la sal de alta concentración contenía un alto nivel de impureza oxidante, lo que demuestra que el lavado de sal de alta concentración desorbió la impureza de la resina de la columna o mAb.

Los resultados generalmente indican que la afinidad de la impureza oxidante por el ligando de la proteína A, el esqueleto de la resina y/o el mAb se alteran con soluciones de alta fuerza iónica, compatibles con una interacción iónica.

Tabla 4

ID muestra	Diferencia, A412	Presencia de impureza oxidante
Eluato (bajo, 50 mM, lavado salino)	0,407	positivo
Eluato (moderado, 150 mM, lavado salino)	0,095	negativo
Eluato (alto, 500 mM, lavado salino)	0,053	negativo
Fracción de lavado NaCl alto	0,910	positivo
DEVNKB_1 (Control positivo)	0,573	positivo
Tampón_1 (Control negativo)	-0,020	negativo

#### Filtración de profundidad

5 La filtración de profundidad también se analizó para determinar su capacidad para eliminar la impureza oxidante. El filtro de profundidad, un filtro Millipore X0HC, se humedeció con 50-100 l/m<sup>2</sup> de agua y se equilibró con al menos 15 l/m<sup>2</sup> de tampón de equilibrio (por ejemplo, pH de 7,5-8 y la concentración de NaCl de 50-100 mM). La filtración se realizó a 230 l/ m<sup>2</sup>/ h. (LMH) con un factor de carga objetivo de 20-60 l/m<sup>2</sup>. Para recuperar el producto, el filtro se enjuagó con tampón de equilibrio de volumen suficiente para asegurar que se alcanzara el pico de recolección objetivo. El filtrado se recogió por absorbancia a 280 nm. Usando tales condiciones, se eliminó la impureza oxidante.

10

#### Intercambio aniónico - Capto Q

15 Se observó que una columna de intercambio aniónico fuerte Capto Q (GE Healthcare Life Sciences, Catálogo # 17-5316) produjo la eliminación de impurezas oxidantes cuando se operaba en modo de flujo continuo con un tampón a un pH de 8,0 y una conductividad <8 mS/cm (por ejemplo, 5-7 mS/cm). Estas condiciones proporcionan un punto de partida para evaluar la eliminación de impurezas oxidantes utilizando una columna Capto Q. Se demostró para el anticuerpo 1 que se requiere un tampón que tiene baja conductividad y pH alto para la depuración efectiva de la impureza oxidante. La columna Capto Q se hizo funcionar en modo de flujo continuo. En condiciones apropiadas, el mAb no fue retenido por la resina, mientras que la impureza oxidante fue adsorbida por la resina. La impureza oxidante se extrajo posteriormente de la resina usando un tampón con alto contenido de sal. Para un segundo anticuerpo, el anticuerpo 2, como se muestra en la Tabla 5, la depuración efectiva se demostró a un pH de 7,5 (7,5-8 es efectivo), siempre que la conductividad del tampón fuera de 11 mS/cm (se requiere conductividad menor o igual a 11). Los tampones que tienen un pH de 7 y una conductividad que varía de 11 a 15 mS/cm no fueron efectivos para separar la impureza del mAb en un modo de flujo continuo, al igual que un tampón que tiene un pH de 7,5 y una conductividad de 15 mS/cm.

25

Tabla 5

ID muestra	Diferencia, A412	Presencia de impureza oxidante
pH 7/cond 11	0,200	positivo
pH 7/cond 15	0,227	positivo
pH 7,5/cond 11	-0,006	negativo
pH 7,5/cond 15	0,190	positivo
Carga Capto Q	0,415	positivo
Tampón control	-0,020	negativo

Membrana de fenilo

5 Se ha hallado que Sartobind Phenyl®, cuando opera en modo de flujo continuo, elimina efectivamente la impureza oxidante de las preparaciones de anticuerpos producidas en las células CHO. En condiciones apropiadas, la impureza oxidante se retiene con la membrana mientras que el mAb no. La impureza oxidante se puede extraer posteriormente de la resina usando un tampón de bajo contenido de sal. La carga se prepara mediante la dilución del anticuerpo a una molaridad de citrato deseada (típicamente citrato de sodio 0,3-0,4 M) y pH (típicamente 6-8). La membrana se equilibra en 5 volúmenes de membrana (MV) de tampón de equilibrio seleccionado para que coincida con la carga de anticuerpo diluida. La carga diluida se aplica posteriormente a la membrana, y la membrana se lava con 10MV de tampón de equilibrio. La preparación de anticuerpos, libre de impurezas oxidantes, sale en el flujo continuo. El material unido se eluye con, por ejemplo, Tris 50 mM, pH 8, y la membrana se regenera con, por ejemplo, 5 MV de fosfato de sodio 25 mM, IPA 20% a pH 6,5. El proceso opera a 10 ml/min o 3,3 MV/min. Se recoge el pico entero de flujo, por ejemplo, de 0,1-0,1 AU a 280 nm utilizando una trayectoria de flujo de 2 mm.

15 La Tabla 6 proporciona datos de una etapa de purificación en membrana de fenilo. El nivel de impureza oxidante medido en el flujo continuo de fenilo varió de 0,1 a 0,04 unidades de absorbancia.

Tabla 6

ID muestra	$\Delta$ A412	Impureza oxidante
Carga de membrana de fenilo	0,41	Positivo
FT de membrana de fenilo	-0,06	Negativo

20 Para determinar la robustez operativa para usar una membrana de fenilo, en la impureza oxidante presente en el Anticuerpo 2, las preparaciones después de aplicar la etapa de purificación de membrana de fenilo en diferentes condiciones de pH y molaridad de citrato. Ver la Tabla 7. Para reducir el nivel de impureza oxidante en el flujo continuo, la molaridad del citrato opera preferiblemente en el límite superior, 0,4 M.

Tabla 7

pH	Molaridad de citrato	Impureza oxidante ( $\Delta$ 412nm)	Presencia de impureza oxidante
6	0,35	0,05	Negativo
8	0,40	0,00	Negativo
6	0,40	-0,04	Negativo
7	0,40	-0,03	Negativo
7	0,30	0,10	Positivo
8	0,35	0,02	Negativo
8	0,30	0,09	Negativo
6	0,30	0,12	Positivo
7	0,35	0,04	Negativo
7	0,35	0,03	Negativo

25 Si se asocian diferentes versiones de una secuencia con un número de acceso en diferentes momentos, significa la versión asociada con el número de acceso en la fecha de presentación vigente de esta solicitud. La fecha de presentación vigente significa la anterior de la fecha de presentación actual o la fecha de presentación de una solicitud de prioridad que se refiere al número de acceso, si corresponde. Del mismo modo, si se publican diferentes versiones de una publicación, sitio web o similar en diferentes momentos, significa la versión publicada más recientemente en la  
30 fecha de presentación vigente de la solicitud menos que se indique lo contrario.

Listado de secuencias

SEQ ID NO:1

MATGLRRREYIWLLWALTITVSYLVALFSHLLRILTVKKLQWRPVLNLAVLDCAEETNTAVCRD  
FNISGFPTVRFFKAFSKNGSGITLPVADASVETLRRKLIDALESHSDMWSSSRPKLPAKLVEINEF  
FAETNEDYLVLIFEDKDSYVGREVTLDLFQHHIPVHRVLNTERNAVSKFGVVEFPSCYLLFRNGS  
FSRVPVVMESRLFYTSYLKGMSPILVDPPTTTISTDAPVTTDVVPTVWKVANHARIYMADLESS  
LHYIFLVEVGKFSVLEGQRLLALKKLVAVLAKYFPGRPLAQNFLHSIHDWLQRQQRKKIPYKFFR  
AALDNRKEGIVLTEKVNWVGCQGSKPHFRGFPCSLWILFHFLTVQASRYSENHPQEPADGQEV  
QAMRSYVQWFFGCRDCAEHFENMAASTMHRVRSPTSAVLWLWTSHNKVNARLSGAPSEDPYF  
PKVQWPLRELCFDCHNEINGREPVDLEATYRFLKAHFSENIILDTPVAGLATQRNPQILGATPE  
PVMDALELETRNSVLGHERAASTESPGATALNVPVKGPEASGPQALYTGQGPPEHMEEPQRVTQ  
GHTQGQQLSKRDTEVLTLPENHLQGPLELRRGGRSPKQLVNIPEGEPEAPAIRGQGPWLQVL  
GRGFSHLDISLCVGLYSVSFVCLLAMYTYFRARLRTPKGHLVTQ

SEQ ID NO:2:

MRRCGRHSGS PSQMLLLLLP PLLAVPGAG AVQVSVLYSS SDPVTVLNAN TVRSTVLRSN  
GAWAVEFFAS WCGHCIAFAP TWKELAYDVR EWRPVLNLAV LDCAEETNTA VCRDFNISGF  
PTVRFFKAFS KNGSGITLPV ADASVETLRR KLIDALESHS DMWSSSRPKL KPAKLVEINE  
FFAETNEDYLVLIFEDKDSY VGREVTLDLF QHHIPVHRVL NTERNAVSKF GVVEFPSCYL  
LFRNGSFSRV PVMESRLFY TSYLKGMSP ILVDPPTTTI STDAPVTTDV VPTVWKVANH  
ARIYMADLES SLHYIFLEV GKFSVLEGQR LLALKKLVAV LAKYFPGRPL AQNFLHSIHD  
WLQRQQRKKI PYKFFRAALD NRKEGIVLTE KVNWVGCQGS KPHFRGFPCS LWILFHFLTV  
QASRYSENHP QEPADGQEV LQAMRSYVQWF FGCRDCAEHF ENMAASTMHR VRSPTSAVLW  
LWTSHNKVNA RLSGAPSEDP YFPKQWPLR ELCFDCHNEI NGREPVDLE ATYRFLKAHF  
SENIILDTP VAGLATQRNP QILGATPEPH M

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SEATTLE GENETICS, INC.

<120> Preparación de anticuerpos a partir de cultivo de células CHO para conjugación

5

<130> 3100-00111PC

<150> 61/908,568

<151> 2013-11-25

10 <160> 2

<170> PatentIn version 3,5

<210> 1

15 <211 > 690

<212> PRT

<213> Proteína de ovario de hámster chino

<400> 1

20

ES 2 753 269 T3

Met Ala Thr Gly Leu Arg Arg Arg Glu Tyr Ile Trp Leu Leu Trp Ala  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Val Ser Tyr Leu Val Ala Leu Phe Ser His Leu Leu  
 20 25 30

Arg Ile Leu Thr Val Lys Lys Leu Gln Trp Arg Pro Val Leu Asn Leu  
 35 40 45

Ala Val Leu Asp Cys Ala Glu Glu Thr Asn Thr Ala Val Cys Arg Asp  
 50 55 60

Phe Asn Ile Ser Gly Phe Pro Thr Val Arg Phe Phe Lys Ala Phe Ser  
 65 70 75 80

Lys Asn Gly Ser Gly Ile Thr Leu Pro Val Ala Asp Ala Ser Val Glu  
 85 90 95

Thr Leu Arg Arg Lys Leu Ile Asp Ala Leu Glu Ser His Ser Asp Met  
 100 105 110

Trp Ser Ser Ser Arg Pro Lys Leu Lys Pro Ala Lys Leu Val Glu Ile  
 115 120 125

Asn Glu Phe Phe Ala Glu Thr Asn Glu Asp Tyr Leu Val Leu Ile Phe  
 130 135 140

Glu Asp Lys Asp Ser Tyr Val Gly Arg Glu Val Thr Leu Asp Leu Phe  
 145 150 155 160

Gln His His Ile Pro Val His Arg Val Leu Asn Thr Glu Arg Asn Ala



ES 2 753 269 T3

Thr Met His Arg Val Arg Ser Pro Thr Ser Ala Val Leu Trp Leu Trp  
420 425 430

Thr Ser His Asn Lys Val Asn Ala Arg Leu Ser Gly Ala Pro Ser Glu  
435 440 445

Asp Pro Tyr Phe Pro Lys Val Gln Trp Pro Leu Arg Glu Leu Cys Phe  
450 455 460

Asp Cys His Asn Glu Ile Asn Gly Arg Glu Pro Val Trp Asp Leu Glu  
465 470 475 480

Ala Thr Tyr Arg Phe Leu Lys Ala His Phe Ser Ser Glu Asn Ile Ile  
485 490 495

Leu Asp Thr Pro Val Ala Gly Leu Ala Thr Gln Arg Asn Pro Gln Ile  
500 505 510

Leu Gly Ala Thr Pro Glu Pro Val Met Asp Ala Leu Glu Leu Glu Thr  
515 520 525

Arg Asn Ser Val Leu Gly His Glu Arg Ala Ala Ser Thr Glu Ser Pro  
530 535 540

Gly Ala Thr Ala Leu Asn Val Pro Val Gly Lys Pro Glu Ala Ser Gly  
545 550 555 560

Pro Gln Ala Leu Tyr Thr Gly Gln Gly Pro Pro Glu His Met Glu Glu  
565 570 575

Pro Gln Arg Val Thr Gln Gly His Thr Gln Gly Gln Gln His Leu Ser  
580 585 590

Lys Arg Asp Thr Glu Val Leu Thr Leu Pro Glu Val Asn His Leu Gln  
595 600 605

Gly Pro Leu Glu Leu Arg Arg Gly Gly Arg Ser Pro Lys Gln Leu Val  
610 615 620

Asn Ile Pro Glu Gly Glu Pro Glu Ala Pro Ala Ile Arg Gly Gln Gly  
625 630 635 640

Pro Trp Leu Gln Val Leu Gly Arg Gly Phe Ser His Leu Asp Ile Ser  
645 650 655

Leu Cys Val Gly Leu Tyr Ser Val Ser Phe Val Cys Leu Leu Ala Met  
660 665 670

ES 2 753 269 T3

Tyr Thr Tyr Phe Arg Ala Arg Leu Arg Thr Pro Lys Gly His Leu Val  
675 680 685

Thr Gln  
690

<210> 2

<211> 571

5 <212> PRT

<213> Proteína de ovario de hámster chino

<400> 2

ES 2 753 269 T3

Met Arg Arg Cys Gly Arg His Ser Gly Ser Pro Ser Gln Met Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Ala Val Pro Gly Ala Gly Ala Val  
 20 25 30

Gln Val Ser Val Leu Tyr Ser Ser Ser Asp Pro Val Thr Val Leu Asn  
 35 40 45

Ala Asn Thr Val Arg Ser Thr Val Leu Arg Ser Asn Gly Ala Trp Ala  
 50 55 60

Val Glu Phe Phe Ala Ser Trp Cys Gly His Cys Ile Ala Phe Ala Pro  
 65 70 75 80

Thr Trp Lys Glu Leu Ala Tyr Asp Val Arg Glu Trp Arg Pro Val Leu  
 85 90 95

Asn Leu Ala Val Leu Asp Cys Ala Glu Glu Thr Asn Thr Ala Val Cys  
 100 105 110

Arg Asp Phe Asn Ile Ser Gly Phe Pro Thr Val Arg Phe Phe Lys Ala  
 115 120 125

Phe Ser Lys Asn Gly Ser Gly Ile Thr Leu Pro Val Ala Asp Ala Ser  
 130 135 140

Val Glu Thr Leu Arg Arg Lys Leu Ile Asp Ala Leu Glu Ser His Ser  
 145 150 155 160

Asp Met Trp Ser Ser Ser Arg Pro Lys Leu Lys Pro Ala Lys Leu Val  
 165 170 175

Glu Ile Asn Glu Phe Phe Ala Glu Thr Asn Glu Asp Tyr Leu Val Leu  
 180 185 190

ES 2 753 269 T3

Ile Phe Glu Asp Lys Asp Ser Tyr Val Gly Arg Glu Val Thr Leu Asp  
 195 200 205

Leu Phe Gln His His Ile Pro Val His Arg Val Leu Asn Thr Glu Arg  
 210 215 220

Asn Ala Val Ser Lys Phe Gly Val Val Glu Phe Pro Ser Cys Tyr Leu  
 225 230 235 240

Leu Phe Arg Asn Gly Ser Phe Ser Arg Val Pro Val Val Met Glu Ser  
 245 250 255

Arg Leu Phe Tyr Thr Ser Tyr Leu Lys Gly Met Ser Gly Pro Ile Leu  
 260 265 270

Val Asp Pro Pro Thr Thr Thr Ile Ser Thr Asp Ala Pro Val Thr Thr  
 275 280 285

Asp Val Val Pro Thr Val Trp Lys Val Ala Asn His Ala Arg Ile Tyr  
 290 295 300

Met Ala Asp Leu Glu Ser Ser Leu His Tyr Ile Phe Leu Val Glu Val  
 305 310 315 320

Gly Lys Phe Ser Val Leu Glu Gly Gln Arg Leu Leu Ala Leu Lys Lys  
 325 330 335

Leu Val Ala Val Leu Ala Lys Tyr Phe Pro Gly Arg Pro Leu Ala Gln  
 340 345 350

Asn Phe Leu His Ser Ile His Asp Trp Leu Gln Arg Gln Gln Arg Lys  
 355 360 365

Lys Ile Pro Tyr Lys Phe Phe Arg Ala Ala Leu Asp Asn Arg Lys Glu  
 370 375 380

Gly Ile Val Leu Thr Glu Lys Val Asn Trp Val Gly Cys Gln Gly Ser  
 385 390 395 400

Lys Pro His Phe Arg Gly Phe Pro Cys Ser Leu Trp Ile Leu Phe His  
 405 410 415

Phe Leu Thr Val Gln Ala Ser Arg Tyr Ser Glu Asn His Pro Gln Glu  
 420 425 430

Pro Ala Asp Gly Gln Glu Val Leu Gln Ala Met Arg Ser Tyr Val Gln  
 435 440 445

ES 2 753 269 T3

Trp Phe Phe Gly Cys Arg Asp Cys Ala Glu His Phe Glu Asn Met Ala  
 450 455 460

Ala Ser Thr Met His Arg Val Arg Ser Pro Thr Ser Ala Val Leu Trp  
 465 470 475 480

Leu Trp Thr Ser His Asn Lys Val Asn Ala Arg Leu Ser Gly Ala Pro  
 485 490 495

Ser Glu Asp Pro Tyr Phe Pro Lys Val Gln Trp Pro Leu Arg Glu Leu  
 500 505 510

Cys Phe Asp Cys His Asn Glu Ile Asn Gly Arg Glu Pro Val Trp Asp  
 515 520 525

Leu Glu Ala Thr Tyr Arg Phe Leu Lys Ala His Phe Ser Ser Glu Asn  
 530 535 540

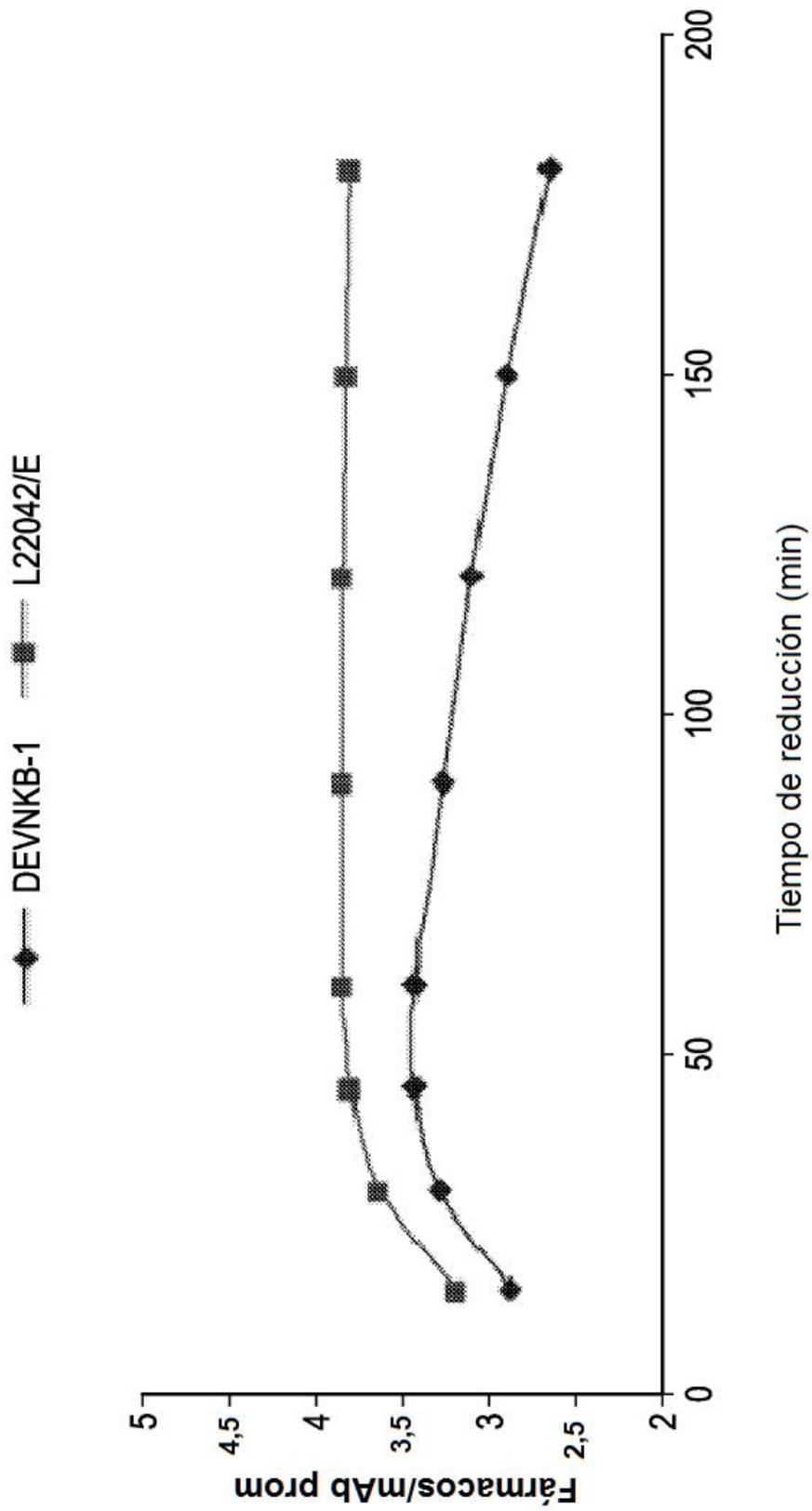
Ile Ile Leu Asp Thr Pro Val Ala Gly Leu Ala Thr Gln Arg Asn Pro  
 545 550 555 560

Gln Ile Leu Gly Ala Thr Pro Glu Pro His Met  
 565 570

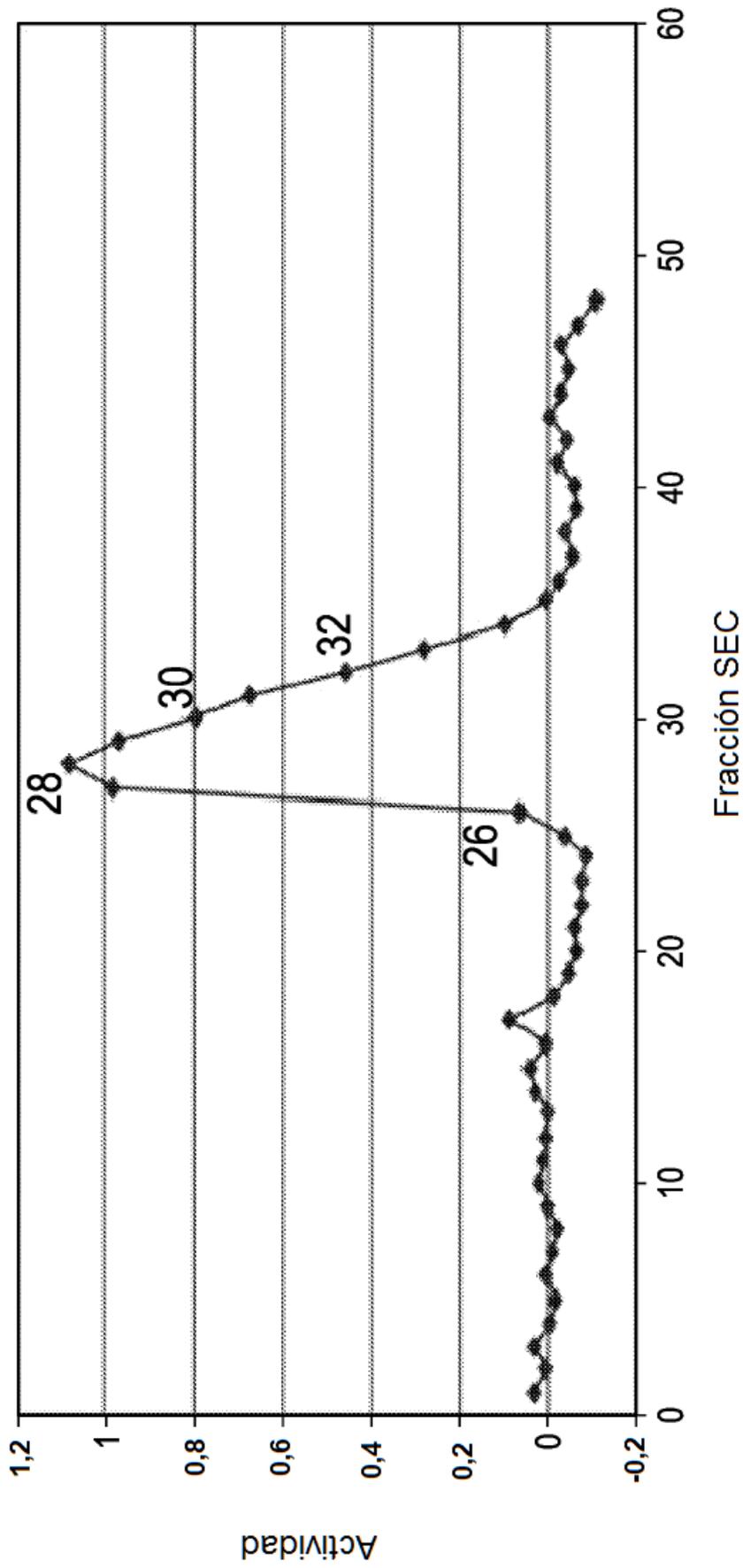
**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de producción de un anticuerpo conjugado, que comprende:
  - 5 (a) realizar al menos una etapa de purificación de un esquema de purificación para obtener al menos una preparación purificada parcialmente de un anticuerpo de un cultivo de células CHO que expresan el anticuerpo;
  - (b) analizar la preparación para determinar la presencia de una enzima oxidante de la célula CHO;
  - (c) si se detecta un nivel inaceptable de la enzima como presente en la preparación de la etapa (b), se repiten las etapas (a) y (b) con una etapa de purificación diferente;
  - 10 (d) si se detecta un nivel aceptable o la ausencia de la enzima oxidante de células CHO como presente en la preparación de la etapa (b), se realiza al menos una etapa de purificación que da como resultado el nivel aceptable o la no detección de la enzima oxidante de células CHO en el mismo cultivo o un segundo cultivo de las células CHO que expresan el anticuerpo para obtener al menos una preparación purificada parcialmente del anticuerpo; y
  - 15 (e) conjugar el al menos anticuerpo purificado parcialmente por medio de uno o más grupos sulfhidrilo con un fármaco para producir el anticuerpo conjugado.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la enzima oxidante de células CHO es QSOX1, y/o
  - en el que el segundo cultivo en la etapa (d) es un cultivo más grande en volumen que el cultivo en la etapa (a), particularmente
  - 20 en el que el segundo cultivo en la etapa (d) es al menos 1000 veces más grande en volumen que el cultivo en la etapa (a).
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las etapas (d) y (e) se realizan múltiples veces en los diferentes cultivos del anticuerpo durante un período de al menos un año.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el esquema de purificación que da como resultado un nivel aceptable o la no detección de la enzima comprende al menos una de una etapa de lavado de una
  - 25 columna de proteína A con un lavado de sal a una concentración de NaCl 150-500 mM, usando filtración de profundidad, intercambio de aniones con una columna de iones de amonio cuaternario, o filtración de membrana de fenilo.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el análisis comprende identificar una banda de 65-75 kDa en un gel, particularmente
  - 30 en el que la banda se identifica por transferencia western o tinción de plata, o
  - en el que el análisis comprende una prueba funcional para la actividad de QSOX1, particularmente
  - en el que el análisis funcional produce peróxido de hidrógeno como un indicador de la actividad, particularmente
  - en el que la actividad se inhibe mediante iones de zinc, inhibición que se revierte por EDTA.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo no es brentuximab, y/o
  - 35 en el que el fármaco se selecciona de agentes anti-tubulina, agentes de unión al surco menor del ADN, inhibidores de replicación del ADN, sensibilizadores de quimioterapia y dímero de pirrolobenzodiazepina.
7. Un procedimiento de determinación de un procedimiento para purificar un anticuerpo de un cultivo celular CHO, que comprende:
  - 40 (a) realizar un procedimiento de purificación para obtener al menos una preparación purificada parcialmente de un anticuerpo de un cultivo de células CHO que expresan el anticuerpo;
  - (b) analizar la preparación para determinar la presencia de la enzima CHO QSOX1;
  - (c) si se detecta un nivel inaceptable de la enzima como presente en la preparación de la etapa (b) se repiten las etapas (a) y (b) con un procedimiento de purificación diferente.
8. Un procedimiento de producción de un anticuerpo conjugado, que comprende:
  - 45 purificar un anticuerpo de un cultivo de células CHO mediante intercambio aniónico con una columna de iones de amonio cuaternario usando un tampón que tiene un pH de 8 y una conductividad de 5-7 mS/cm, en el que el anticuerpo se separa de la enzima QSOX1 en el cultivo; y conjugar el anticuerpo purificado por medio de uno o más grupos sulfhidrilo con un fármaco citotóxico para producir el anticuerpo conjugado.
9. Un procedimiento de producción de un anticuerpo conjugado, que comprende:
  - 50 (a) realizar al menos una etapa de purificación de un esquema de purificación para obtener al menos una preparación purificada parcialmente de un anticuerpo de un cultivo de células CHO que expresan el anticuerpo;
  - (b) conjugar el al menos anticuerpo purificado parcialmente por medio de uno o más grupos sulfhidrilo con un fármaco citotóxico bajo condiciones para producir el anticuerpo conjugado; en el que se produce un nivel inaceptablemente bajo del anticuerpo conjugado;

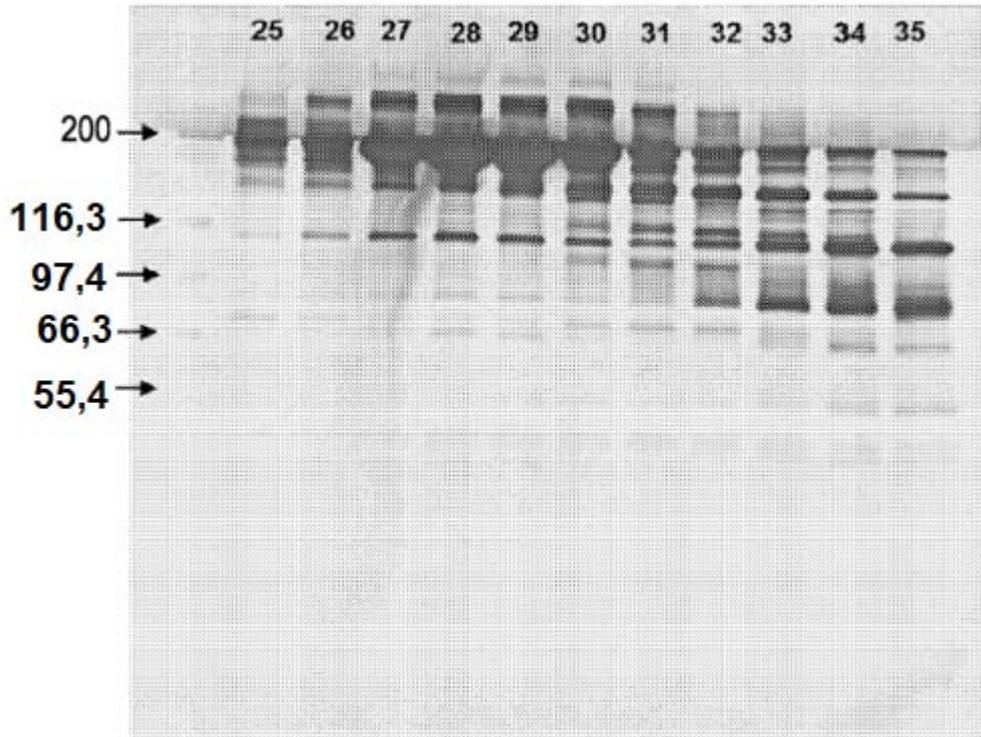
- (c) analizar la preparación purificada de la etapa (a) para determinar la presencia de una enzima oxidante de células CHO;
- (d) si se detecta un nivel inaceptable de la enzima oxidante de células CHO como presente en la etapa (c) se realizan las etapas (a) y (c) con una etapa de purificación diferente hasta ausencia o nivel aceptable de la enzima oxidante de células CHO presente en la etapa (c);
- (e) realizar la al menos una etapa de purificación que da como resultado el nivel aceptable o la no detección de la enzima QSOX1 en un segundo cultivo de células CHO que expresan el anticuerpo para obtener el anticuerpo purificado; y
- (f) conjugar el anticuerpo purificado por medio de uno o más grupos sulfhidrilo con un fármaco citotóxico para producir el anticuerpo conjugado.
- 5
- 10
10. Un procedimiento de producción de un anticuerpo conjugado, que comprende:
- (a) obtener una preparación de anticuerpo;
- (b) analizar la preparación para determinar la presencia de una enzima oxidante de células CHO;
- (c) si se detecta un nivel inaceptable de la enzima como presente en la preparación de la etapa (b), se realiza al menos una etapa de purificación para eliminar la enzima oxidante de células CHO hasta un nivel aceptable; y
- (d) conjugar el al menos anticuerpo purificado parcialmente por medio de uno o más grupos sulfhidrilo con un fármaco para producir el anticuerpo conjugado.
- 15
11. Un procedimiento de determinación de la adecuación de una preparación de anticuerpo para usar como una conjugación farmacéutica que comprende la etapa de:
- 20
- analizar la preparación para determinar la presencia de una enzima oxidante de células CHO;
- si se detecta un nivel aceptable de la enzima como presente en la preparación del anticuerpo, se identifica la preparación como no adecuada para la conjugación farmacéutica y que requiere al menos una etapa de purificación; y si se detecta un nivel aceptable o la ausencia de la enzima como presente en la preparación del anticuerpo, identificar la preparación como adecuada para la conjugación farmacéutica.
- 25
12. Un procedimiento de determinación de la adecuación de una preparación de anticuerpo para la conjugación con un fármaco que comprende la etapa de:
- 30
- analizar la preparación para determinar la presencia de una enzima oxidante de células CHO;
- si se detecta un nivel inaceptable de la enzima como presente en la preparación de anticuerpo, se identifica la preparación como no adecuada para la conjugación con el fármaco y que requiere al menos una etapa de purificación;
- y si se detecta un nivel aceptable o la ausencia de la enzima como presente en la preparación del anticuerpo, se identifica la preparación como adecuada para la conjugación con el fármaco.
- 35
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el anticuerpo es un anticuerpo producido en células CHO, y/o
- en el que la preparación del anticuerpo ya se ha sometido a al menos una etapa de purificación, particularmente en el que la etapa de purificación es una etapa de purificación por cromatografía.
- 40
14. El procedimiento de las reivindicaciones 7 a 13, en el que el análisis comprende la identificación de una banda de 65-75 kDa sobre un gel, particularmente
- en el que la banda se identifica mediante transferencia western o tinción de plata, o
- en el que el análisis comprende una prueba funcional para la actividad de QSOX1, particularmente
- en el que el análisis funcional produce peróxido de hidrógeno como un indicador de la actividad, particularmente
- en el que la actividad se inhibe mediante iones zinc, inhibición que se revierte mediante EDTA.
- 45
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 u 8 a 13, en el que el análisis implica el control de la reacción entre los grupos tiol libres y DTNB en una muestra de control y una muestra de prueba y se comparan las dos.
- 50
16. El procedimiento de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la al menos una etapa de purificación comprende al menos una de un lavado de una columna de proteína A con un lavado de sal a una concentración de NaCl 150-500 mM, usando filtración de profundidad, intercambio aniónico con una columna de iones de amonio cuaternario, o filtración de membrana de fenilo.



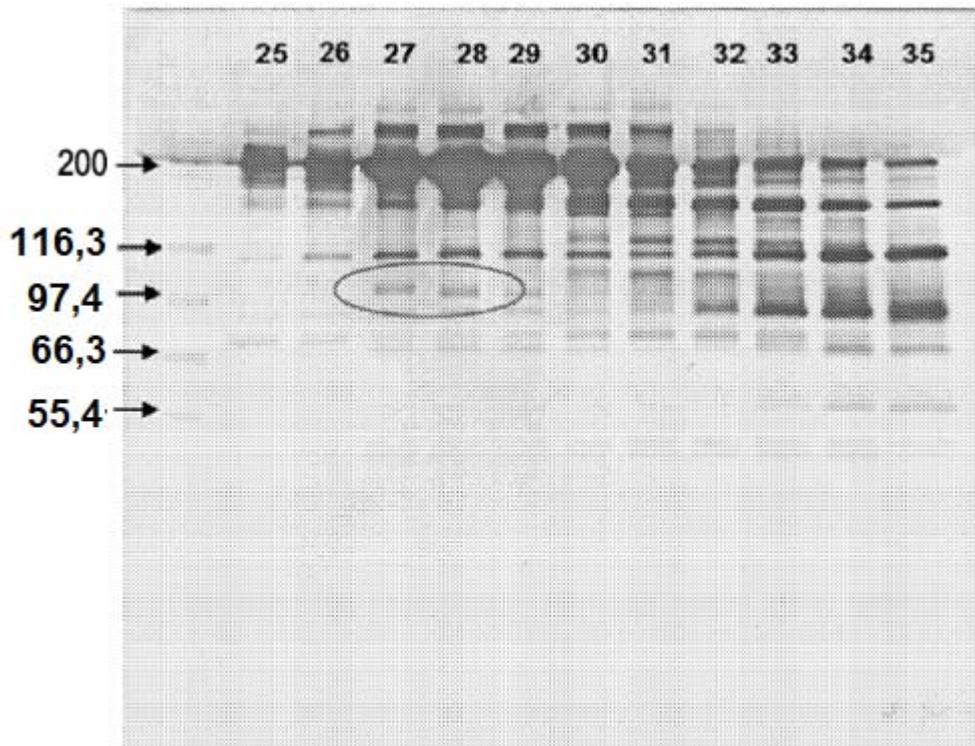
*Fig. 1*



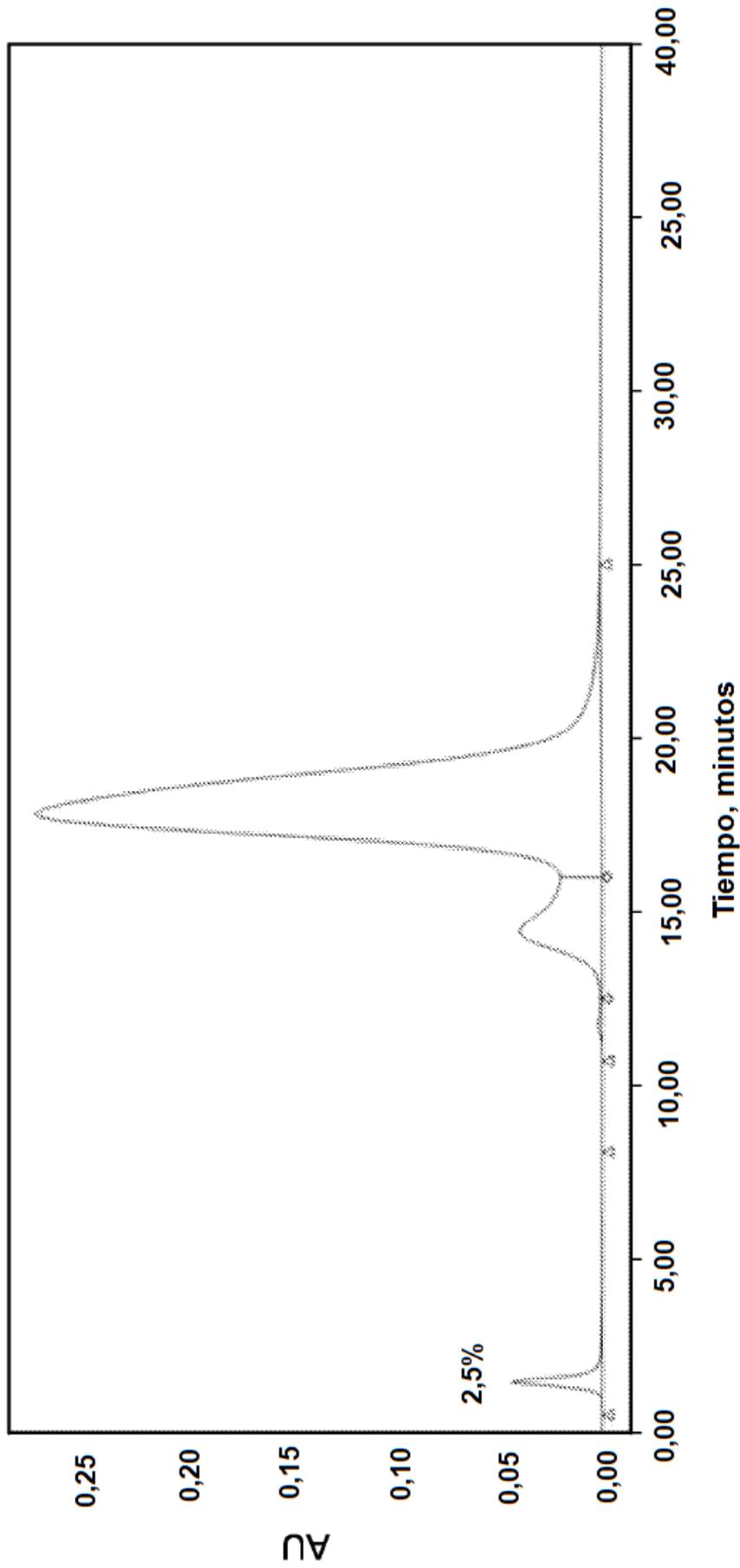
*Fig. 2A*



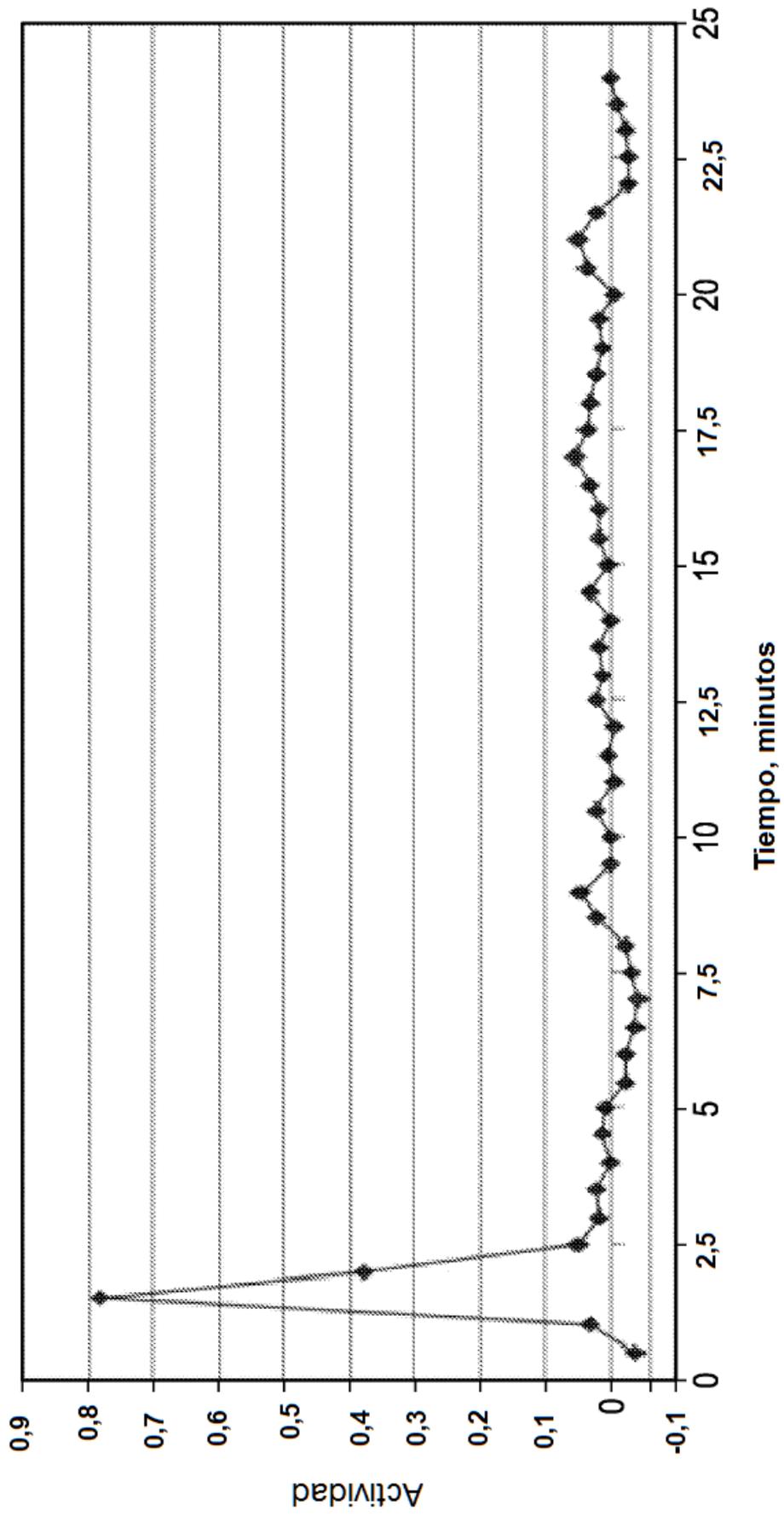
*Fig. 2B*



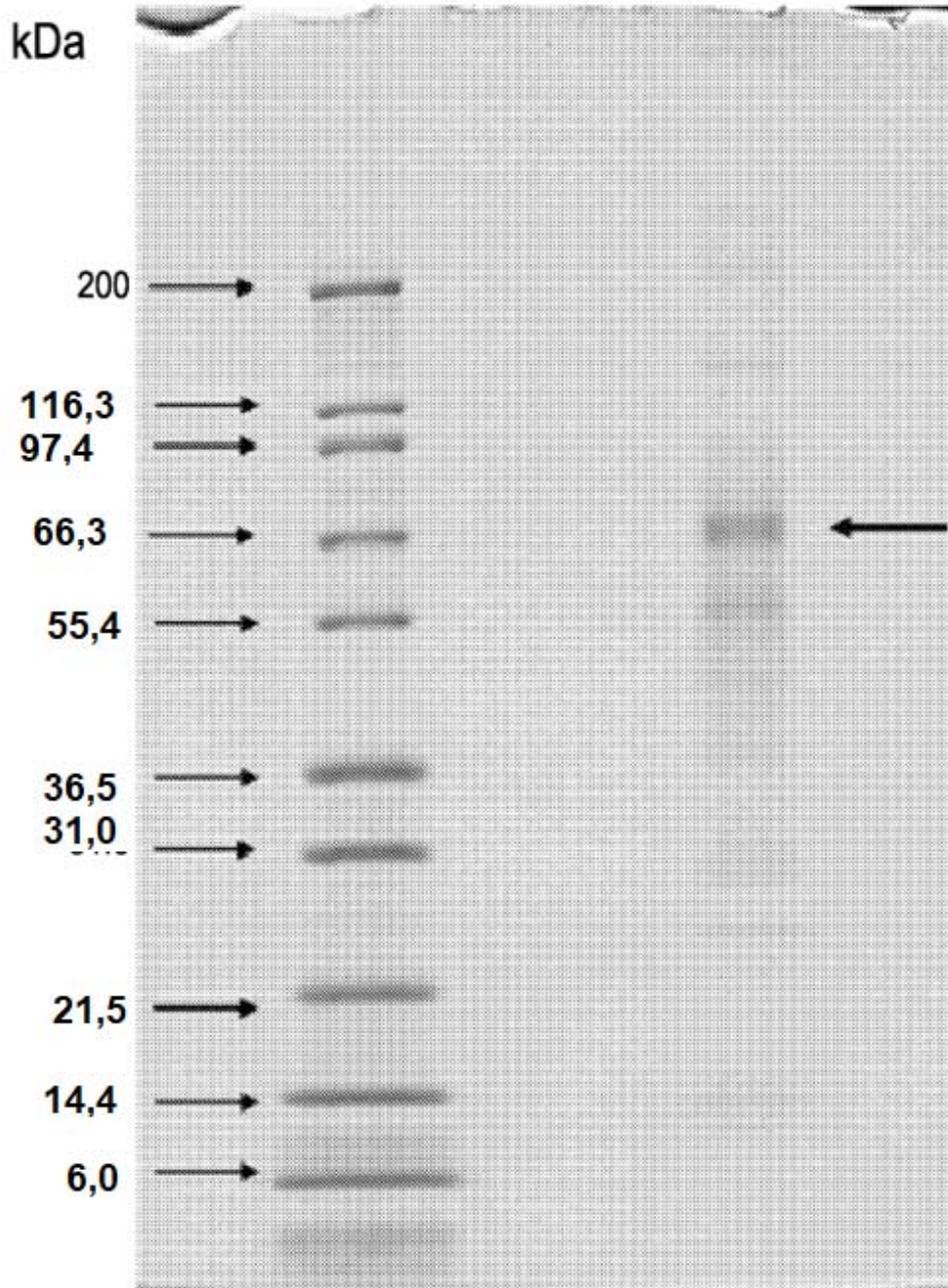
*Fig. 2C*



*Fig. 3A*



*Fig. 3B*



*Fig. 3C*