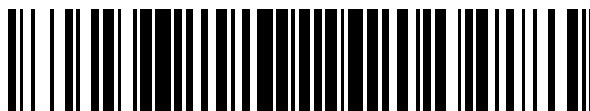


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 232**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2008 E 11172109 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **19.07.2017 EP 2381254**

54 Título: **Análisis de copolímeros**

30 Prioridad:

21.06.2007 US 945488 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
23.11.2017

73 Titular/es:

**MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
675 West Kendall Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**D'ALESSANDRO, JOSEPHINE S.;
KISHIMOTO, TAKASHI KEI y
HEALY, AILEEN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 477 232 T5

DESCRIPCIÓN

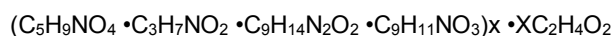
Análisis de copolímeros.

Campo

- 5 El contenido descrito en el momento presente se refiere en general a métodos para caracterizar mezclas complejas de péptidos o polipéptidos. Más en particular, el contenido descrito en el momento presente se refiere a métodos basados en células para evaluar una o más propiedades de un copolímero de aminoácidos.

Antecedentes

- 10 El copolímero-1 es una mezcla compleja de polipéptidos preparados a partir de la polimerización de los aminoácidos: ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina. El copolímero-1 también es conocido como acetato de glatiramer y presenta la siguiente fórmula estructural:



- 15 El acetato de glatiramer (GA, por sus siglas en inglés) es el ingrediente activo de COPAXONE® (Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Israel), que comprende las sales de acetato de polipéptidos sintéticos que contienen cuatro aminoácidos que se encuentran en la naturaleza: ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina, con una fracción molar promedio reseñada de 0,141; 0,427; 0,095 y 0,338, respectivamente.

El acetato de glatiramer se usa en el tratamiento de la forma con recaídas y remisiones de la esclerosis múltiple (RRMS, por sus siglas en inglés).

- 20 El artículo por Li et al., European Journal of Pharmacology, 342, 1.998, 303-310, describe que el acetato de glatiramer bloquea la activación de THP-1 por IFN- γ .

La patente internacional WO 03/048735 A2 describe un procedimiento para medir la potencia relativa de un lote de ensayo de acetato de glatiramer.

- 25 El artículo por Li et al., Journal of Neurochemistry, 2.001, 77, 1.208-1.217, se refiere a la inhibición del acetato de glatiramer de la expresión de RANTES inducida por TNF- α y la liberación de células astrocíticas humanas U-251 MG.

El artículo por Milo et al., Journal of Neuroimmunology, 61, 1.995, 185-193, se refiere a efectos aditivos de acetato de glatiramer e interferón β -1b sobre la respuesta inmunitaria a la proteína básica de mielina.

El artículo por Farina et al., Brain, 2.001, 124, 705-719, describe el tratamiento de esclerosis múltiple con Copaxone.

- 30 El artículo por Abdelaziz et al., Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2.004, 288, se refiere a la inhibición de la producción de TNF- α en macrófagos de THP-1 por acetato de glatiramer.

Sumario

- 35 La presente invención proporciona métodos y composiciones para evaluar una o más propiedades de un agente candidato, es decir el copolímero de aminoácidos acetato de glatiramer, como se definió en las reivindicaciones 1, 2, 9 y 11. En un aspecto, la invención proporciona una variedad de realizaciones para evaluar una preparación de copolímero de aminoácidos para propiedades fisiológicas, farmacodinámicas, farmacocinéticas o farmacéuticas incluyendo, pero no limitado a, potencia, especificidad, estabilidad, actividad biológica, por ej., para conveniencia como una preparación farmacéutica, por ej., para el tratamiento de enfermedad, trastornos o disfunciones autoinmunitarias y/o inflamatorias.

- 40 Una o más propiedades de la preparación de copolímero de aminoácidos (por ej., de una preparación de copolímero de aminoácidos de ensayo), tal como potencia, especificidad, estabilidad y/o actividad biológica, se pueden evaluar comparando los resultados del análisis (por ej., un valor de ensayo cualitativo o cuantitativo que corresponde a la inducción, producción, secreción, presencia o nivel de una proteína regulada) con un valor de referencia, por ej., un valor predeterminado para correlacionarse con un nivel particular de potencia, especificidad, estabilidad y/o actividad biológica de copolímero, por ej., un valor predeterminado para correlacionarse con un nivel de potencia, especificidad, estabilidad y/o actividad biológica del copolímero adecuado para una preparación farmacéutica útil para tratar una enfermedad, trastorno o disfunción descrita en la presente memoria. En una realización, el valor de referencia es un perfil de inducción de citocinas, rango de equivalencia o especificación farmacéutica para potencia, especificidad, estabilidad y/o actividad biológica para una preparación farmacéutica comercializada de acetato de glatiramer. En otras realizaciones, el valor de referencia es un valor determinado por medición directa de una propiedad de un compuesto de referencia, por ej., una preparación de acetato de glatiramer de referencia. En una realización, el valor de ensayo se considera comparable al valor de referencia si está dentro de 25%, 20%, 15%,
- 50

10%, 5%, 2%, 1% o menos del valor de referencia.

En una realización, la célula usada en el ensayo es un leucocito, es decir una célula mieloide, por ej., una estirpe celular mieloide o célula primaria, por ej., célula mononuclear de la sangre (por ej., células T, células destructoras naturales, monocitos, macrófagos, etc.), célula polimorfonuclear de la sangre (por ej., eosinófilos, basófilos, neutrófilos, megacariocitos, etc.), célula dendrítica y célula tímicas. La célula puede ser una estirpe celular mieloide tumorigénica tal como THP-1, U937, SiHa o HL-60. Adicionalmente, se pueden usar células mononucleares de sangre periférica de mamíferos así como monocitos procedentes de médula ósea y monocitos.

En una realización, la proteína regulada por la molécula proinflamatoria IFN- γ (cuya inducción, producción, secreción, presencia o nivel se detecta en el ensayo) es una quimiocina, por ej., una quimiocina regulada por IFN- γ . En una realización, la quimiocina se selecciona del grupo que consiste en: proteína 10 inducible por interferón- γ (IP-10), quimioatrayente- α de células T inducible con interferón (I-TAC), monocina inducida por interferón- γ (MIG). Otras proteínas o citocinas solubles inducidas por IFN- γ incluyen las mostradas en la Tabla 1. La inducción, producción, secreción, presencia o nivel de una proteína regulada se puede detectar directamente, por ej., por un método basado en anticuerpo, tal como un ELISA o indirectamente, por ej., por técnicas conocidas en la técnica para detectar transcripciones para la proteína o por uso de un análisis de gen informador.

En algunas realizaciones, la exposición de la célula o las células al copolímero de aminoácidos e IFN- γ da como resultado una inducción sinérgica de una o más de las proteínas reguladas por citocina. En un ejemplo, la exposición de células mieloides al copolímero de aminoácidos acetato de glatiramer e IFN γ da como resultado una inducción sinérgica de una o más quimiocinas o citocinas reguladas por IFN γ (por ej., de IP-10, I-TAC, MIG y/u otros ligandos de CXCR3). En una realización, la inducción de una citocina regulada puede ser al menos 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 300 veces o más por encima de los valores de control (por ej., por encima de controles negativos sin molécula proinflamatoria y/o sin copolímero).

La invención proporciona además un método para preparar una composición farmacéutica de acetato de glatiramer que comprende preparar un lote de acetato de glatiramer, evaluar la potencia, especificidad, actividad biológica y/o estabilidad de la composición por un método descrito en la presente memoria y determinar que el acetato de glatiramer es aceptable para uso farmacéutico si se detecta al menos un nivel predeterminado de una o más proteínas reguladas por la citocina y/o si la proteína regulada se induce a un nivel dentro del 80%-125% (por ej., al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 100%, 110%, 115%, 120%, 125%) de un valor de referencia.

También se describe un método para preparar una composición farmacéutica que comprende acetato de glatiramer, que comprende: polimerizar N-carboxianhídridos de L-alanina, ácido L-glutámico bencil-prottegido, L-lisina y L-tirosina protegidas con ácido trifluoroacético (TFA) para generar un copolímero protegido; tratar el copolímero protegido para despolimerizar parcialmente el copolímero protegido y desproteger grupos bencil-prottegidos y desproteger lisinas protegidas con TFA para generar acetato de glatiramer y aislar el acetato de glatiramer, en el que la mejora comprende: medir la expresión de una proteína inducida por IFN- γ en una célula mieloide o una estirpe celular mieloide primaria en presencia de IFN- γ y una muestra del acetato de glatiramer aislado y comparar la expresión con el valor de referencia. En diversas realizaciones de este método de preparación: la mejora comprende además seleccionar el acetato de glatiramer purificado para uso en la preparación de una composición farmacéutica si la diferencia entre la expresión medida y el valor de referencia está dentro de un intervalo predeterminado y la mejora comprende además: preparar una composición farmacéutica que comprende al menos una porción del acetato de glatiramer purificado seleccionado.

Algunos aspectos del contenido descrito en el momento presente que se han indicado anteriormente, que se estudian en su totalidad o en parte por el contenido descrito en el momento presente, otros aspectos se harán evidentes a medida que transcurra la descripción cuando se consideren en relación a los Ejemplos y la Figura que se adjuntan como se describe mejor en la presente memoria a continuación.

Breve descripción de la figura

La Figura 1 ilustra la secreción de IP-10, I-TAC y MIG durante aproximadamente 24 horas en diversos medios que contienen suero o exentos de suero a una concentración constante de IFN γ (10 ng/ml). La condición de FBS al 10% se ensayó a 50, 10, 2 y 0 μ g/ml de acetato de glatiramer (GA). Las condiciones de FBS al 2%, FBS al 0% y X-VIVO15 se analizaron a 50 y 0 μ g/ml de GA. M representa el portador de control de manitol que se analizó a 100 μ g/ml. Los números por encima de las barras representan las veces de incremento por encima del control (0 μ g/ml).

Descripción detallada

El contenido descrito en el momento presente se describirá ahora más completamente de ahora en adelante con referencia a la figura que se adjunta, en que se muestran algunas, pero no todas las realizaciones del contenido descrito en el momento presente. Muchas modificaciones y otras realizaciones del contenido descrito en el momento presente explicadas en la presente memoria le vendrán a la mente a un experto en la materia al que se refiere el contenido descrito en el momento presente con el beneficio de las explicaciones presentadas en las descripciones anteriores y la figura asociada. Por lo tanto, se tiene que entender que el contenido descrito en el momento presente

no se tiene que limitar a las realizaciones específicas descritas y que las modificaciones y otras realizaciones se destinan a estar incluidas dentro del alcance de las realizaciones adjuntas. Aunque se emplean términos específicos en la presente memoria, se usan en un sentido genérico y descriptivo sólo y no para fines de limitación.

- 5 Siguiendo el convenio de derecho sobre patentes de larga data, los términos "un," "uno" y "el" se refieren a "uno o más" cuando se usan en esta solicitud, incluyendo las realizaciones. Así, por ejemplo, la referencia a "una muestra" incluye una pluralidad de muestras, a menos que el contexto sea claramente para lo contrario (por ej., una pluralidad de muestras), etc.

Visión general

- 10 La presente invención proporciona métodos y composiciones para evaluar una o más propiedades de acetato de glatiramer que pueden ser útiles como una preparación terapéutica, por ej., para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario, neurodegenerativo, desmielinizante o inflamatorio. Los análisis descritos en la presente memoria pueden ser de cualquier formato conocido en la técnica, incluyendo análisis de cultivo celular, análisis de cultivo de órganos o análisis *ex vivo*.

- 15 Una "molécula proinflamatoria" es una molécula que estimula la activación de leucocitos, células epiteliales o células estromales que da como resultado la amplificación o propagación de una respuesta inmunitaria inflamatoria. Una molécula proinflamatoria puede inducir la producción de marcadores de activación (por ej., ligando CD69, CD25, CD54, CD40, CD11b, CD62L, CD83, CD95) y/o secreción de otras citocinas y/o quimiocinas pro-inflamatorias de células inmunitarias tales como células T CD4, células T CD8, células B, células NK, monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, basófilos, eosinófilos y mastocitos. La invención utiliza la citocina pro-inflamatoria IFN- γ que es una proteína segregada pequeña que presenta las propiedades de una molécula proinflamatoria como se describe en la presente memoria. Una "quimiocina" es una citocina con actividad quimiotáctica. Ejemplos de quimiocinas incluyen IL-8, RANTES, MIP-1a, MCP-1, IP-10, Mig, I-TAC, TARC, I-309.

- 25 Los diversos métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para evaluar una o más propiedades de una preparación de acetato de glatiramer, tal como potencia, especificidad, estabilidad, pureza y actividad biológica, por comparación de la preparación de copolímero de ensayo con uno o más valores de referencia predeterminados, tales como un valor de especificación farmacéutica para potencia, especificidad, estabilidad y actividad biológica de acetato de glatiramer. En algunos casos, se puede determinar un valor de referencia por comparación con un agente conocido. Este agente conocido se refiere en la presente memoria como un "agente de referencia" o un "compuesto de referencia." Un agente de referencia preferido de la invención es un copolímero de aminoácidos (por ej., una preparación farmacéutica de acetato de glatiramer) que es adecuado para uso como preparación farmacéutica, por ej., se ha mostrado que presenta eficacia terapéutica en uno o más trastornos o afecciones autoinmunitarias, degenerativas, desmielinizantes y/o inflamatorias. Por "eficacia terapéutica" se desea que el agente sea capaz de prevenir, tratar o aliviar los síntomas asociados al trastorno o afección.

- 35 En una realización, el valor de referencia es un valor de especificación farmacéutica predeterminado para acetato de glatiramer. En una realización, el compuesto de referencia es preparación farmacéutica de acetato de glatiramer. En una realización, se ha observado la inducción sinérgica de proteínas reguladas por citocinas en diversos tipos de células cuando se administran conjuntamente con citocina suministrada de manera exógena y copolímero-1. Como se usa en la presente memoria, el término "sinérgico" se refiere a dos o más agentes (por ej., acetato de glatiramer y una citocina) que son más eficaces en asociación que la suma de los efectos individuales de cada agente único sólo. Esta inducción sinérgica de proteínas reguladas por citocinas se puede usar para investigar una preparación de copolímeros de ensayo para propiedades, incluyendo actividad biológica, que sean comparables con acetato de glatiramer.

- 45 El acetato de glatiramer está homologado para la reducción de la frecuencia de recaídas en pacientes con esclerosis múltiple con recaídas y remisiones. La esclerosis múltiple se ha clasificado como una enfermedad autoinmunitaria. El acetato de glatiramer también se ha descrito para uso en el tratamiento de otras enfermedades autoinmunitarias, enfermedades no autoinmunitarias inflamatorias y para fomentar la regeneración nerviosa y/o para prevenir o inhibir la degeneración secundaria que puede seguir a la lesión del sistema nervioso principal. Además, el acetato de glatiramer se ha descrito como un tratamiento para enfermedades mediadas por el sistema inmunitario así como enfermedades asociadas a la desmielinización. Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para evaluar la actividad de una preparación de acetato de glatiramer para conveniencia como preparación farmacéutica para cualquiera de estos trastornos.

Análisis *in vitro*

- 55 Los métodos y las composiciones de la presente invención comprenden análisis útiles para evaluar una o más propiedades del acetato de glatiramer. En una realización, se investiga una preparación de copolímero de ensayo usando un ensayo *in vitro* para evaluar el efecto de la preparación de copolímero en la producción y/o secreción de una o más proteínas reguladas por IFN- γ . El nivel de inducción regulada por IFN- γ de la proteína o las proteínas en presencia de una preparación de copolímero de ensayo se compara con el nivel de la inducción regulada por citocina proinflamatoria de esa o esas proteínas en el mismo tipo de célula en presencia de un agente de referencia.

El nivel (es decir, nivel cualitativo o cuantitativo) y la naturaleza (es decir, especies de proteína) de inducción se refiere en la presente memoria como el "perfil de inducción de citocinas." El perfil de inducción de citocinas se puede usar para valorar una o más propiedades del acetato de glatiramer, tales como potencia, estabilidad, especificidad y actividad biológica. En una realización, se dice que una preparación de ensayo es adecuada como una composición farmacéutica cuando el perfil de inducción de citocinas de la preparación de ensayo (por ej., el nivel de inducción o el número de proteínas similares que son inducidas o ambos) está entre aproximadamente 80% y aproximadamente 125%, incluyendo aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, aproximadamente 100%, aproximadamente 105%, aproximadamente 110%, aproximadamente 115%, aproximadamente 120%, hasta aproximadamente 125% de un valor de referencia o perfil para una composición farmacéutica de copolímero (por ej., un lote de COPAXONE®). En otra realización, se dice que una preparación de ensayo presenta sustancialmente las mismas propiedades que una preparación de copolímero de referencia (por ej., COPAXONE®) cuando el perfil de inducción de citocinas de la preparación de ensayo (por ej., el nivel de inducción o el número de proteínas similares que son inducidas o ambos) está entre aproximadamente 80% y aproximadamente 125%, incluyendo aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, aproximadamente 100%, aproximadamente 105%, aproximadamente 110%, aproximadamente 115%, 120%, hasta aproximadamente 125% de la preparación de copolímero de referencia.

En una realización, la referencia es acetato de glatiramer con eficacia terapéutica conocida en uno o más trastornos autoinmunitarios o inflamatorios. En una realización específica, el agente de referencia es acetato de glatiramer. El valor de referencia puede ser un valor predeterminado para corresponderse con un cierto nivel de potencia, pureza, estabilidad u otra actividad de acetato de glatiramer.

Una o más células capaces de producir o segregar una proteína regulada por citocinas se pone en contacto con acetato de glatiramer o un agente de referencia a una concentración y tiempo suficiente para la inducción de la proteína regulada por citocinas. El análisis puede comprender dos o más tipos de células, que pueden ser células primarias, estirpes celulares o combinaciones de las mismas. La concentración y el tiempo suficiente para la inducción de la proteína regulada por citocinas son los que dan como resultado la producción o secreción detectable de la proteína regulada por citocinas por encima del nivel de esa proteína en ausencia de acetato de glatiramer o agente de referencia (por ej., por encima de los niveles de los valores de referencia de la proteína que se regula por la citocina). La concentración del acetato de glatiramer puede estar presente en el medio de análisis a una concentración de al menos aproximadamente 0,05 µg/ml, al menos aproximadamente 1 µg/ml, al menos aproximadamente 2 µg/ml, al menos aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 125, aproximadamente 150, aproximadamente 175, aproximadamente 200, aproximadamente 225, aproximadamente 250, aproximadamente 275, aproximadamente 300, aproximadamente 375, aproximadamente 400, aproximadamente 425, aproximadamente 450, aproximadamente 475, al menos aproximadamente 500 µg/ml o mayor, siempre que la concentración no alcance la que es citotóxica.

El acetato de glatiramer o agente de referencia se puede incubar (es decir, "poner en contacto") con la célula capaz de segregar o producir la proteína regulada por citocinas durante al menos aproximadamente 1 hora, al menos aproximadamente 1,5 horas, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 3 horas, al menos aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33, aproximadamente 34, aproximadamente 35, aproximadamente 36, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 48 o más horas.

En una realización, una cantidad de la citocina proinflamatoria que regula la expresión de la proteína descrita anteriormente se puede añadir de manera exógena al medio de análisis. La citocina se puede añadir antes, al mismo tiempo que o después de la adición de la preparación de copolímero de ensayo o de referencia. En una realización, la citocina se añade al mismo tiempo que la preparación de copolímero de ensayo o de referencia. La citocina puede estar presente en el medio de análisis a una concentración de al menos aproximadamente 1 ng/ml, al menos aproximadamente 2 ng/ml, al menos aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50 ng/ml o mayor, siempre que la concentración no alcance la que es citotóxica. En algunas realizaciones, la citocina se puede expresar de manera heteróloga en la célula huésped del análisis. El gen heterólogo puede estar bajo el control de un activador constitutivo o uno inducible.

En diversos aspectos de la presente invención, la citocina que regula la producción y secreción de una o más proteínas descritas en la presente memoria es una citocina proinflamatoria. Las citocinas proinflamatorias se asocian típicamente a una respuesta de células T Th1. En una realización, la citocina pro-inflamatoria se selecciona del grupo que incluye, pero no está limitado a, TNF α , interferón gamma (IFN γ), interleucina-1 (IL-1), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-1 (IL-2) interleucina-6 (IL-6), interleucina-4 (IL-4), interleucina-8 (IL-8), interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13), interleucina-17 (IL-17), interleucina-18 (IL-18), interleucina-23 (IL-23) y linfotóxina- α . En los análisis descritos en la presente memoria, la citocina está presente en una concentración suficiente para inducir la producción o secreción de una o más proteínas reguladas por esa citocina. En una realización, la proteína regulada por citocinas comprende proteínas (por ej., quimiocinas) que están reguladas por interferón gamma, incluyendo proteína 10 inducible por interferón γ (IP-10), quimioatrayente- α de células T inducible con interferón (I-TAC) y monocina inducida por interferón- γ (MIG). IP-10, MIG e I-TAC se expresan dentro de las lesiones del SNC en tanto Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE) como esclerosis múltiple (MS) y el receptor que une estos ligandos, CXCR3, se expresa en células T que infiltran lesiones de EAE y MS así como en células T en el líquido cefalorraquídeo y la periferia de pacientes de MS durante exacerbaciones (revisado en Klein et al. (2.004) *J Immunol* 172: 550-559).

Células

Muchos tipos de células mieloides encuentran uso en los métodos de la presente invención siempre que puedan producir una o más proteínas reguladas por las citocinas descritas en la presente memoria. Se incluyen, sin limitación, células implicadas en respuestas inflamatorias, por ej., células mononucleares de la sangre (por ej., células T, células destructoras naturales, monocitos, macrófagos, etc.), células polimorfonucleares de la sangre (por ej., eosinófilos, basófilos, neutrófilos, megacariocitos, etc.) y células dendríticas. También se incluyen estirpes celulares tumorigénicas tales como THP-1, U937, SiHa y HL-60. Adicionalmente, también se pueden usar células mononucleares de sangre periférica de mamíferos así como monocitos procedentes de médula ósea y monocitos aislados por elutriación o aislamiento de perlas magnéticas negativo.

Condiciones del cultivo celular.

Las formulaciones de medios de cultivo celular son conocidas en la bibliografía y muchas están comercialmente disponibles. En una realización, las células en el análisis se cultivan en medio sin suero. Los métodos para preparar medios sin suero son conocidos en la técnica. Los ingredientes pueden incluir aminoácidos (ambos D y/o L-aminoácidos) tales como glutamina, alanina, arginina, asparagina, cistina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina y sus derivados; subgrupos solubles en ácido tales como tiamina, ácido ascórbico, compuestos férricos, compuestos ferrosos, purinas, glutatión y fosfatos de sodio monobásicos.

Ingredientes adicionales pueden incluir azúcares, desoxirribosa, ribosa, nucleósidos, vitaminas solubles en agua, riboflavina, sales, metales traza, lípidos, sales de acetato, sales de fosfato, HEPES, rojo fenol, sales de piruvato y tampones.

Otros ingredientes usados con frecuencia en formulaciones del medio incluyen vitaminas solubles en grasa (incluyendo vitaminas A, D, E y K), esteroides y sus derivados, colesterol, ácidos grasos y lípidos, Tween 80, 2-mercaptoetanol piramidinas, así como una variedad de suplementos incluyendo suero (fetal, caballo, ternera, etc.), proteínas (insulina, transferrina, factores de crecimiento, hormonas, etc.), antibióticos (gentamicina, penicilina, estreptomycin, anfotericina B, etc.), ultrafiltrado de huevo completo y factores de unión (fibronectinas, vitronectinas, colágenos, lamininas, tenascinas, etc.). El experto sabe determinar las condiciones apropiadas bajo las que se propaga una célula útil en los métodos de la presente invención.

Las células se pueden cultivar de cualquier manera conocida en la técnica incluyendo en suspensión, en monocapa, en perlas o en tres dimensiones. Los métodos de cultivo de células y tejidos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures*; Freshney (1.987), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la destreza de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., ed. (2.001) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (Edición de Lab 3d; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Wu et al., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155; Mayer and Walker, eds. (1.988) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, Londres); Herzenberg, Weir and Blackwell, eds., (1.996) *Weir's Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV.

Medición de inducción de proteínas.

La inducción de una proteína regulada por citocinas como se describe en la presente memoria se puede evaluar en una variedad de diferentes formas, cada una de las cuales es conocida para los expertos en la materia. La medición puede ser cuantitativa o cualitativa, siempre que la medición pueda indicar si el nivel de la proteína regulada por

citocinas de interés en la muestra esté en, por encima de o por debajo de un valor de referencia. El nivel de inducción, así como las proteínas específicas que se inducen, de una o más de las proteínas reguladas por citocina (en la presente memoria referidas como el "perfil de inducción de citocinas") puede ser comparado con un perfil de referencia de inducción de citocinas (por ej., un perfil que se ha predeterminado para corresponderse con una actividad particular o nivel de actividad) o al perfil de inducción de citocinas de uno o más de un agente de referencia y un agente de control negativo. Un agente de control negativo puede ser, por ej., uno que no presenta potencia o actividad o uno que no induce producción de proteínas reguladas por citocinas en el tipo de célula utilizado en el análisis o ambos.

El perfil de inducción de citocinas se puede usar como una medida de una propiedad o actividad biológica. Las propiedades tales como potencia, especificidad y estabilidad se pueden evaluar usando el perfil de inducción de citocinas. Para los fines de la presente invención, se evalúan potencia y actividad biológica evaluando el nivel de inducción de una o más proteínas reguladas por citocina. La "especificidad" se evalúa, por ej., identificando o distinguiendo la preparación de ensayo como que es acetato de glatiramer frente a no acetato de glatiramer basado en los resultados. La estabilidad se puede evaluar comparando el perfil de inducción de citocinas del agente candidato con el agente de referencia en el tiempo. En algunas realizaciones, el perfil de inducción de citocinas se puede usar como una medida de equivalencia para un agente de referencia.

En una realización, la inducción de la proteína regulada por citocinas se detecta usando un método inmunológico. Los métodos inmunológicos que se pueden usar para detectar inducción de proteínas reguladas por citocinas incluyen, pero no se limitan a, sistemas de análisis competitivo y no competitivo usando técnicas con base inmunitaria tales como métodos Western, radioinmunoanálisis, ELISA (análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas), ELISA múltiple, inmunoanálisis de "sándwich", análisis de inmunoprecipitación, reacciones de la precipitina, reacciones de la precipitina de difusión en gel, análisis de inmunodifusión, análisis de aglutinación, análisis de fijación del complemento, análisis inmunoradiométricos, inmunoanálisis fluorescentes, inmunoanálisis de proteína A y similares. Dichos análisis son rutinarios y conocidos en la técnica (véase, por ej., Ausubel et al, eds, 1.994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, que se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad). Se describen inmunoanálisis ejemplares brevemente a continuación (pero no se destinan a limitación).

Los protocolos de inmunoprecipitación comprenden en general obtener sobrenadante del medio de análisis (opcionalmente enriquecido con proteína fosfatasa y/o inhibidores de la proteasa, por ej., ácido etilendiaminotetraacético (AEDT), fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF, por sus siglas en inglés), aprotinina, vanadato de sodio), añadiendo una molécula de unión de interés (es decir, una molécula, tal como un anticuerpo, que se une específicamente a la proteína regulada por citocinas de interés) al sobrenadante, incubando durante un periodo de tiempo (por ej., 1 a 4 horas) a aproximadamente 4°C, añadiendo perlas de proteína A y/o proteína G seferosa al lisado de células, incubando durante aproximadamente una hora o más a aproximadamente 4°C, lavando las perlas en tampón y volviendo a suspender las perlas en dodecilsulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés)/tampón de muestra. La capacidad de la molécula de unión de interés para inmunoprecipitar un antígeno particular se puede evaluar por, por ej., análisis por el método Western. Un experto en la materia sería conocedor en cuanto a los parámetros de que se pueden modificar para aumentar la unión de la molécula de unión a una proteína regulada por citocinas y disminuir el fondo (por ej., pre-aclarando el sobrenadante con perlas de seferosa). Para más discusión considerando los protocolos de inmunoprecipitación, véase, por ej., Ausubel et al., eds, 1.994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.16.1, que se incorpora por la presente por referencia en la presente memoria en su totalidad.

El análisis por el método Western comprende en general preparar muestras de proteína del sobrenadante de análisis, electroforesis de las muestras de proteínas en un gel de poliácridamida (por ej., SDS-PAGE al 8%-20% dependiendo del peso molecular del antígeno), transferir la muestra de proteínas del gel de poliácridamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, bloquear la membrana en disolución de bloqueo (por ej., PBS con BSA al 3% o leche desnatada), lavar la membrana en tampón de lavado (por ej., PBS-Tween 20), bloquear la membrana con la molécula de unión de interés (por ej., un anticuerpo específico para la proteína regulada por citocinas de interés) diluida en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, bloquear la membrana con un anticuerpo (que reconoce la molécula de unión, por ej., un anticuerpo secundario) conjugado a un sustrato enzimático (por ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) o molécula radiactiva (por ej., ³²P o ¹²⁵I) diluida en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado y detectar la presencia de la proteína regulada por citocinas. Un experto en la materia sería conocedor en cuanto a los parámetros de que se pueden modificar para aumentar la señal detectada y para reducir el ruido de fondo. Para más discusión considerando los protocolos del método Western véase, por ej., Ausubel et al., eds, 1.994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.8.1, que se incorpora por la presente por referencia en la presente memoria en su totalidad.

Los ELISA comprenden preparar proteína regulada por citocinas, recubrir el pozo de una placa de microtítulo de 96 pozos con la proteína regulada por citocinas de interés o un sobrenadante de análisis que comprende la proteína regulada por citocinas de interés, añadir la molécula de unión de interés conjugada a un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) al pozo e incubar durante un periodo de tiempo y detectar la presencia de la proteína regulada por citocinas. En los ELISA, la molécula de unión

de interés no tiene que estar conjugada a un compuesto detectable; en su lugar, se puede añadir al pozo un anticuerpo (que reconoce la molécula de unión de interés) conjugado a un compuesto detectable. Además, en vez de recubrir el pozo con la proteína regulada por citocinas de interés o un sobrenadante de ensayo que comprende la proteína regulada por citocinas de interés, la molécula de unión se puede recubrir al pozo. En este caso, un anticuerpo conjugado a un compuesto detectable se puede añadir después de la adición de la proteína regulada por citocinas de interés o un sobrenadante de análisis que comprende la proteína regulada por citocinas de interés al pozo recubierto. Un experto en la materia sería conocedor en cuanto a los parámetros de que se pueden modificar para aumentar la señal detectada así como otras variaciones de los ELISA conocidos en la técnica. Para más discusión considerando los ELISA véase, por ej., Ausubel et al, eds., 1.994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1, que se incorpora por la presente por referencia en la presente memoria en su totalidad. Se pueden obtener diversos estuches de ELISA de fuentes comerciales tales como BioSource International (Montreal, Canadá), BD Biosciences (San Jose, CA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Millipore Corp. (Bedford, MA) y Pierce (Rockville, IL).

También se pueden usar mediciones basadas en la afinidad que utilizan una molécula que se une específicamente a la proteína regulada por citocinas que se está midiendo (un "reactivo de afinidad," tal como un anticuerpo o aptámero), así como otras tecnologías, tales como tecnologías basadas en la espectroscopía (por ej., desorción mediante láser asistida por matriz-tiempo de vuelo o MALDI-TOF, espectroscopía).

Las tecnologías basadas en la afinidad incluyen análisis basados en anticuerpos (inmunoanálisis como se describió anteriormente) y análisis que utilizan aptámeros (moléculas de ácido nucleico que se unen de manera específica a otras moléculas), tal como ELONA. Adicionalmente, también se consideran análisis que utilizan tanto anticuerpos como aptámeros (por ej., un ensayo de formato sándwich que utiliza un anticuerpo para captura y un aptámero para detección). En general, los anticuerpos se pueden sustituir por aptámeros en casi todos los formatos de inmunoanálisis, aunque los aptámeros permiten formatos de análisis adicionales (tales como amplificación de aptámeros ligados usando tecnología de amplificación de ácidos nucleicos tal como PCR (Patente de EE.UU. N° 4.683.202) o amplificación isotérmica con matrices de material compuesto (Patentes de EE.UU. Nos. 6.251.639 y 6.692.918).

Los análisis basados en la afinidad pueden estar en competición o formatos de reacción directa, utilizan formatos de tipo sándwich y pueden ser además heterogéneos (por ej., utilizan soportes sólidos) u homogéneos (por ej., tienen lugar en una sola fase) y/o utilizan inmunoprecipitación. La mayoría de los análisis implica el uso de reactivo de afinidad marcado (por ej., anticuerpo, polipéptido o aptámero); las etiquetas pueden ser, por ejemplo, moléculas enzimáticas, fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivas o colorantes. También se conocen análisis que amplifican las señales de la sonda; ejemplos de los cuales son análisis que utilizan biotina y avidina e inmunoanálisis marcados y mediados por enzimas, tales como los análisis ELISA y ELONA.

En un formato heterogéneo, el análisis utiliza dos fases (típicamente líquido acuoso y sólido). Típicamente un reactivo de afinidad específico de proteína regulada por citocinas está ligado a un soporte sólido para facilitar la separación de la proteína regulada por citocinas del volumen de la muestra. Después de reacción durante un tiempo suficiente para permitir la formación de complejos de reactivo de afinidad/proteína regulada por citocinas, el soporte sólido o la superficie que contiene el anticuerpo se lava típicamente previamente a la detección de polipéptidos ligados. El reactivo de afinidad en el análisis para medición de proteínas reguladas por citocinas se puede proporcionar sobre un soporte (por ej., sólido o semi-sólido); alternativamente, los polipéptidos en la muestra se pueden inmovilizar sobre un soporte o superficie. Ejemplos de soportes que se pueden usar son nitrocelulosa (por ej., en forma de membrana o pozo de microtítulo), poli(cloruro de vinilo) (por ej., en láminas o pozos de microtítulo), látex de poliestireno (por ej., en perlas o placas de microtítulo), poli(fluoruro de vinilideno), papel diazotizado, membranas de nailon, perlas activadas, perlas de vidrio y Proteína A. Los dos formatos, estándar y competitivo, para estos análisis son conocidos en la técnica.

Los análisis heterogéneos de tipo matriz son adecuados para medir niveles de proteínas reguladas por citocina cuando los métodos de la invención se practican utilizando múltiples proteínas reguladas por citocina. Los análisis de tipo matriz usados en la práctica de los métodos de la invención utilizarán comúnmente un sustrato sólido con dos o más reactivos de captura específicos para diferentes proteínas reguladas por citocina ligadas al sustrato en un patrón predeterminado (por ej., una rejilla). La muestra (por ej., sobrenadante de análisis) se aplica al sustrato y las proteínas reguladas por citocina en la muestra se ligan por los reactivos de captura. Después de eliminación de la muestra (y lavado apropiado), las proteínas reguladas por citocina ligadas se detectan usando una mezcla de reactivos de detección apropiados que unen de manera específica las diversas proteínas reguladas por citocina. La unión del reactivo de detección se realiza comúnmente usando un sistema visual, tal como un sistema a base de colorante fluorescente. Debido a que los reactivos de captura se disponen sobre el sustrato en un patrón predeterminado, los análisis de tipo matriz proporcionan la ventaja de detección de múltiples proteínas reguladas por citocinas sin la necesidad de un sistema de detección múltiple.

En un formato homogéneo el ensayo tiene lugar en fase única (por ej., fase líquida acuosa). Típicamente, la muestra se incuba con un reactivo de afinidad específico para la proteína regulada por citocinas en disolución. Por ejemplo, puede estar en condiciones que precipiten cualquier complejo de reactivo de afinidad/anticuerpo que se forme. Los dos formatos, estándar y competitivo, para estos análisis son conocidos en la técnica.

En un formato estándar (reacción directa), el nivel de complejo de proteína regulada por citocinas/reactivo de afinidad se controla directamente. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, determinando la cantidad de un reactivo de detección marcado que se forma ligado a complejos de proteína regulada por citocinas/reactivo de afinidad. En un formato competitivo, la cantidad de proteína regulada por citocinas en la muestra se deduce controlando el efecto competitivo sobre la unión de una cantidad conocida de proteína marcada regulada por citocinas (u otro ligando de competición) en el complejo. Las cantidades de formación de unión o de complejo se pueden determinar cualitativamente o cuantitativamente.

Además de inmunoanálisis, se puede medir la inducción evaluando patrones de expresión de los genes que codifican las proteínas reguladas por citocina o de genes informadores. Por ejemplo, los patrones de expresión se pueden evaluar por análisis Northern, PCR, RT-PCR, análisis Taq Man, análisis de protección de ribonucleasas, detección con FRET, controlando una o más balizas moleculares, hibridación a una matriz de oligonucleótidos, hibridación a una matriz de ADNc, hibridación a una matriz de polinucleótidos, hibridación a una micromatriz líquida, hibridación a una matriz microelectrónica, secuenciación de ADNc, hibridación de clones, impresión digital de fragmentos de ADN y similares. El método particular elegido dependerá de factores tales como la cantidad de ARN recuperado, la preferencia del profesional cualificado, los reactivos y el equipo disponibles, detectores y similares.

Como entenderán los expertos en la materia, el modo de detección de la señal dependerá del sistema de detección exacto utilizado en el análisis. Por ejemplo, si se utiliza un reactivo de detección radiomarcado, la señal se medirá usando una tecnología capaz de cuantificar la señal de la muestra o comparando la señal de la muestra con la señal de una muestra de referencia, tal como contador de centelleo, autoradiografía (típicamente combinado con densitometría de barrido) y similares. Si se usa un sistema de detección quimioluminiscente, entonces la señal se detectará típicamente usando un luminómetro. Los métodos para detectar señal de sistemas de detección son conocidos en la técnica y no es necesario describirlos más en la presente memoria.

Cuando se mide más de una proteína regulada por citocinas, la muestra se puede dividir en una serie de alícuotas, usándose alícuotas separadas para medir diferente proteína regulada por citocinas (aunque también se considera la división de la muestra en múltiples alícuotas para permitir múltiples determinaciones de los niveles de la proteína regulada por citocinas en una muestra particular). Alternativamente, la muestra (o una alícuota de la misma) se puede ensayar para determinar los niveles de proteína regulada por citocinas múltiples en una sola reacción usando un análisis capaz de medir los niveles individuales de diferente proteína regulada por citocinas en un solo análisis, tal como un análisis de tipo matriz o análisis que utiliza tecnología de detección múltiple (por ej., un análisis que utiliza reactivos de detección marcados con diferentes marcadores de colorante fluorescentes).

Es común en la técnica realizar mediciones "replicadas". Normalmente, se obtienen mediciones replicadas por división de una muestra en múltiples alícuotas y midiendo por separado el biomarcador o los biomarcadores en reacciones separadas del mismo sistema de análisis. Las mediciones replicadas no son necesarias para los métodos de la invención, pero muchas realizaciones de la invención utilizarán ensayo de replicados, en particular ensayo por duplicado y triplicado. En algunas realizaciones, el agente de referencia y el agente candidato se analizarán usando alícuotas separadas de células obtenidas del mismo cultivo celular. En otra realización, el agente de referencia (y/o control negativo) y el agente candidato se analizará usando el mismo lote de células. En esta realización, cada agente se analiza en momentos diferentes, se reemplaza el medio de análisis entre mediciones y se permite que las células se recuperen a una densidad celular apropiada después de cada medición.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden implantar y/o registrar los resultados usando cualquier dispositivo capaz de implantar los métodos y/o registrar los resultados. Ejemplos de dispositivos que se pueden usar incluyen, pero no están limitados a, dispositivos computacionales electrónicos, incluyendo ordenadores de todos los tipos. Cuando se implantan los métodos descritos en la presente memoria y/o se registran en un ordenador, el programa informático que se puede usar para configurar el ordenador para realizar las etapas de los métodos puede estar contenido en cualquier medio que pueda leer el ordenador capaz de contener el programa informático. Los ejemplos de medio que puede leer el ordenador que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, disquetes, los CD-ROM, los DVD, ROM, RAM y otros dispositivos de memoria y almacenaje del ordenador. El programa informático que se puede usar para configurar el ordenador para realizar las etapas de los métodos y/o registrar los resultados también se pueden proporcionar por una red electrónica, por ejemplo, por internet, intranet u otra red.

El procedimiento de comparación de un valor medido y un valor de referencia se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente apropiada para el tipo de valor medido y valor de referencia para la proteína regulada por citocinas en cuestión. Como se discutió anteriormente, la "medición" se puede llevar a cabo usando técnicas de medición cuantitativas o cualitativas y el modo de comparar un valor medido y un valor de referencia puede variar dependiendo de la tecnología de medición empleada. Por ejemplo, cuando se usa un análisis colorimétrico cualitativo para medir los niveles de proteína regulada por citocinas, los niveles se pueden comparar por comparación de manera visual de la intensidad del producto de reacción coloreado o por comparación de datos de mediciones densitométricas o espectrométricas del producto de reacción coloreado (por ej., comparando datos numéricos o datos gráficos, tales como gráficos de barras, procedentes del dispositivo de medición). Sin embargo, se espera que los valores medidos usados en los métodos de la invención sean lo más comúnmente valores cuantitativos (por ej., mediciones cuantitativas de concentración, tales como nanogramas de proteína regulada por citocinas por mililitro de muestra o cantidad absoluta). En otros ejemplos, los valores medidos son cualitativos. Como

con mediciones cualitativas, la comparación se puede hacer por inspección de los datos numéricos o por inspección de representaciones de los datos (por ej., inspeccionando representaciones gráficas tales como gráficos de barras o de líneas).

- 5 En general se considera que un valor medido es sustancialmente similar a un valor de referencia si es aproximadamente 80% a aproximadamente 125% del valor de referencia.

- 10 El procedimiento de comparación puede ser manual (tal como inspección visual por el profesional habilitado del método) o puede ser automatizado. Por ejemplo, un dispositivo de análisis (tal como un luminómetro para medir señales quimioluminiscentes) puede incluir circuitos y programas informáticos que le permiten comparar un valor medido con un valor de referencia para una proteína regulada por citocinas. Alternativamente, se puede usar un dispositivo separado (por ej., un ordenador digital) para comparar el valor o los valores medidos y el valor o los valores de referencia. Los dispositivos automatizados para comparación pueden incluir valores de referencia almacenados para la proteína o las proteínas reguladas por citocinas que se están midiendo o pueden comparar el valor o los valores medidos con valores de referencia que proceden de muestras de referencia medidas contemporáneamente (por ej., muestras de acetato de glatiramer).
- 15 Como será evidente para los expertos en la materia, cuando se toman mediciones por replicado para el biomarcador o los biomarcadores ensayados, el valor medido que se compara con el valor de referencia es un valor que tiene en cuenta las mediciones replicadas. Las mediciones replicadas se pueden considerar usando la media o la mediana de los valores medidos como el "valor medido".

Método de preparación de acetato de glatiramer.

- 20 Los métodos y las composiciones de la presente invención son útiles para evaluar una o más propiedades de un lote de acetato de glatiramer. Los métodos comprenden preparar un lote de acetato de glatiramer, evaluar uno o más de estabilidad, especificidad, potencia y actividad biológica usando los análisis descritos en la presente memoria y comparar las propiedades del lote de acetato de glatiramer con los de un compuesto de referencia (por ej., un lote estandarizado de acetato de glatiramer, por ej., uno que se haya homologado para uso terapéutico) o valor de referencia para un compuesto de referencia (por ej., una especificación farmacéutica para acetato de glatiramer). Se dice que el lote de acetato de glatiramer es aceptable para uso farmacéutico si al menos se detecta un nivel predeterminado de una o más proteínas reguladas por citocina. El "nivel predeterminado" es el que se puede detectar usando el compuesto de referencia o el que se especifica en una especificación farmacéutica para acetato de glatiramer.
- 25 Los siguientes Ejemplos se han incluido para proporcionar guía a un experto en la materia para practicar realizaciones representativas del contenido descrito en el momento presente. A la luz de la presente descripción y el nivel general de destreza en la técnica, los expertos pueden apreciar que los siguientes Ejemplos están destinados a ser ejemplares sólo y que se pueden emplear numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin apartarse del alcance del contenido descrito en el momento presente. Así, se ofrecen los siguientes Ejemplos a modo de ilustración y no a modo de limitación.
- 30
- 35

Ejemplos

Ejemplo 1: Análisis de copolímero.

Métodos

- 40 Se recibieron células THP-1 (ATCC, TIB-202) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Se mostró que las células THP-1 estaban libres de contaminación por micoplasmas usando un análisis de cultivo directo multimédios combinado con un análisis de tinción con el fluorocromo de ADN - células indicadoras (cat. # M-250, Bionique Testing Laboratories, Inc., Saranac Lake, NY). Se cultivaron células en medio de cultivo completo y se incubaron en una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C.

- 45 Se preparó medio de análisis fresco el día del análisis. El medio de análisis consistió en Suplemento Glutamax I 2 mM (Invitrogen, 35050-79) en medio sin suero X-VIVO 15 (Cambrex, 04-418Q). Estos reactivos se filtraron en una unidad de filtro de acetato de celulosa de 0,2 micrómetros (Nalgene, 156-4.020). Después de filtración, se cubrió el frasco con papel de estaño para proteger el medio de la luz.

- 50 Se almacenó COPAXONE® (acetato de glatiramer; Teva Pharmaceuticals) en la jeringa del fabricante a 4°C. Se prepararon muestras a una concentración X2 en el medio de análisis de IFN-γ X2 en tubos de microfuga siliconizados, estériles. Las concentraciones finales de 0 µg/ml a 400 µg/ml se ensayaron en el análisis.

Se reconstituyó IFN-γ humano (R&D Systems, 285-IF-100) con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,2% estéril en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) (Chemicon, 3.225-80).

El día previo al análisis, se sembraron células THP-1 a 2 x 10⁵ células/ml (20 ml de volumen final). Estas células se recogieron por centrifugación a 400 x g, 5 min, 18°C. Se lavaron las células una sola vez con medio de análisis (sin

IFN- γ) y se volvieron a suspender en medio de análisis (sin IFN- γ) y se contaron. Se volvieron a suspender células THP-1 a 5×10^5 células/ml en medio de análisis (con 0, 1, 10 y 100 ng/ml de concentración final de IFN- γ). Se sembraron células de concentraciones bajas a altas de acetato de glatiramer (50, 10, 2 y 0 ng/ml) a 50 μ l por pozo con una pipeta multicanal. Se incubaron las placas de análisis durante 0 a 23 horas en una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C.

Se recogió medio acondicionado en tubos siliconizados, no estériles. Se centrifugaron los tubos a 400 x g, 5 min, 4°C. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos siliconizados nuevos y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Se almacenó medio acondicionado congelado a -80°C hasta que se sometieron a análisis de citocina múltiple Searchlight (Pierce Endogen, Woburn, MA).

Resultados

Efecto de COPAXONE® en un amplio panel de proteínas:

Se examinó el efecto de COPAXONE®, junto con IFN- γ en la secreción de un amplio panel de citocinas, quimiocinas, receptores solubles y proteasas de células THP-1. La adición de COPAXONE®, indujo un aumento acusado en la secreción de la quimiocina, IP-10 (Tabla 1). IP-10 es una quimiocina regulada por IFN- γ que se une al receptor de CXCR3. Curiosamente, el tratamiento de COPAXONE® también dio como resultado mayores niveles de IFN- γ observados en el medio de cultivo a 24 h, aún cuando se añadió IFN- γ de manera exógena al comienzo del experimento. El efecto de COPAXONE® sobre la producción de IFN- γ puede justificar en parte su acción sinérgica sobre la secreción de IP-10. Otras quimiocinas tales como MCP-1 y MDC, que se unen a los receptores de CCR2 y CCR4, respectivamente, también mostraron una respuesta secretora robusta a COPAXONE®, aunque la magnitud de la inducción no fue tan alta como se observó con IP-10 (Tabla 1). De manera similar, otras citocinas, tales como IL6, mostraron una respuesta sinérgica a COPAXONE® e IFN- γ . Algunas quimiocinas, tales como RANTES y TARC y las citocinas, tales como IL-10, IL12, p70, TNF α , TIMP1 y MMP9 mostraron pequeños incrementos con tratamiento de COPAXONE®.

Tabla 1: Efecto de tratamiento de COPAXONE® sobre la secreción de quimiocina y citocina de células THP-1.

Quimiocinas	IP10	MCP1	MDC	I309	IL-8	MIP1 α	RANTES	TARC
IFN γ sólo (10 ng/ml)	17,9*	32,3*	2,2*	1,6*	25,6*	10,5*	96,7*	11,7*
IFN γ +50 μ g/ml I356	4.060,5*	688,2*	23,6*	15,6*	217,1*	73,9*	352,2*	35,2*
Veces de incremento	226,3	21,3	10,6	9,7	8,5	7,1	3,6	3,0

Citocinas	IFN γ	IL-6	IL1 β	IL-10	IL12p70	TNF α
IFN γ sólo (10 ng/ml)	470,9*	0,2*	0,2*	0,4*	4,6*	33,3*
IFN γ + 50 μ g/ml I356	4.575,9*	3,8*	0,5*	0,7*	8,9*	61,3*
Veces de incremento	9,7	19,0	2,4	2,0	1,9	1,8

Receptores/Proteasas	ICAM1	MMP2	TNFR1	TNFR2	TIMP1	MMP9
IFN γ sólo (10 ng/ml)	46,4*	158,2*	6,9*	11,0*	3.848,4*	39,1*
IFN γ + 50 μ g/ml I356	279,9*	915,9*	35,8*	34,4*	6.364,3*	8,9*
Veces de incremento	6,0	5,8	5,2	3,1	1,7	0,2

*pg/ml

Efectos sinérgicos:

Algunas realizaciones del análisis muestran un efecto sinérgico. La Figura 1 ilustra el efecto sinérgico de COPAXONE® e IFN- γ en la secreción de IP-10 y otras quimiocinas. Las células THP-1 tratadas con IFN- γ sólo mostraron sólo una producción modesta de IP-10, I-TAC y MIG (todos ligandos de CXCR3). La adición de COPAXONE® junto con IFN- γ indujo un efecto dependiente de la concentración, acusado, sobre la secreción de las tres quimiocinas. Los niveles de IP-10, I-TAC y MIG segregados en presencia de 50 μ g/ml de COPAXONE® y 10 ng/ml de IFN- γ fueron 329-, 412- y 573 veces mayores, respectivamente, que los valores de referencia que

contienen IFN- γ sólo. Los niveles de IFN- γ medidos a las 24 horas también mostraron un incremento dependiente de la concentración con tratamiento de COPAXONE®. Las células THP-1 se cultivaron en presencia de diversas concentraciones de suero fetal bovino (FBS) o en medio sin suero X-VIVO15. COPAXONE® indujo una secreción robusta de las tres quimiocinas, IP-10, MIG e I-TAC, así como secreción de IFN- γ en todas las condiciones; sin embargo, las células cultivadas en el medio definido sin suero X-VIVO15 mostraron las mayores veces de la inducción por encima de los valores de referencia. Se observó una respuesta similar con otras dos estirpes celulares mieloides humanas, U-937 y HL-60 y con células dendríticas humanas primarias.

La Tabla 2 muestra las veces de la inducción para IP-10, I-TAC y MIG con tratamiento de COPAXONE® e IFN- γ por encima de IFN- γ sólo a las 23 horas. Las veces de la inducción por encima de los valores de referencia son máximas para 1-10 ng/ml de IFN- γ . En gran medida, las células THP-1 no producen ninguna cantidad significativa de IP-10 cuando se tratan con COPAXONE® en ausencia de IFN- γ e IFN- γ sólo (en ausencia de COPAXONE®) induce sólo pequeñas cantidades de secreción de quimiocinas. El efecto sinérgico de COPAXONE® e IFN- γ se ilustra claramente en la Tabla 2. Se pueden detectar niveles inferiores de IP-10, I-TAC y MIG en el ensayo tan claramente como 3-6 horas de tratamiento con COPAXONE® y las concentraciones de IFN- γ mayores; sin embargo, el intervalo dinámico es mejor a las 18-24 horas a que se pueden usar concentraciones de IFN- γ inferiores.

Tabla 2. Inducción de quimiocinas a las 23 horas (expresado como veces de incremento por encima del control (0))

	IP-10			I-TAC			MIG		
	GA (μ g/ml)			GA (μ g/ml)			GA (μ g/ml)		
	0	2	10	0	2	10	0	2	10
IFN γ 0 ng/ml	0	0	0	1	1	4	1	1	1
IFN γ 10 ng/ml	1	72	233	1	10	51	1	21	284
IFN γ 100 ng/ml	1	49	67	1	46	113	1	39	333
IFN γ 1.000 ng/ml	1	13	14	1	23	49	1	23	160

Dependencia de la dosis:

La Tabla 3 muestra la dependencia de la concentración del análisis. Los valores de pg/ml con desviaciones estándar se muestran para inducción mediada por IFN- γ (10 ng/ml) de IP-10, I-TAC y MIG a cada concentración de acetato de glatiramer (GA). Cada valor representa 12 muestras de 6 análisis de THP-1 independientes con puntos duplicados, cada uno medido a las 22-24 horas de incubación. En este caso, la lectura fue ensayo ELISA múltiple Endogen Searchlight. Los números de pg/ml absolutos serán diferentes dependiendo del método de detección. Por ejemplo, se puede observar una diferencia de 5-10 veces entre el ensayo ELISA múltiple Endogen Searchlight y un ELISA estándar. Los números absolutos también serán diferentes dependiendo del tiempo de incubación y la concentración de IFN- γ . Sin embargo, dentro del mismo formato y método de análisis, el análisis se puede usar para comparar dos o más preparaciones de copolímero y/o para determinar un valor de referencia (por ej., un intervalo de equivalencia) por comparación con los valores obtenidos con una preparación de ensayo.

Tabla 3: Dependencia de la dosis de acetato de glatiramer (GA).

[GA] mg/ml	IP-10 pg/ml $\pm$ Dev. Std.		I-TAC pg/ml $\pm$ Dev. Std.		MIG pg/ml $\pm$ Dev. Std.	
0	13,5	2,8	3,2	0,8	13,6	2,3
0,78	259,2	69,1	16,5	5,2	149,7	33,2
1,56	483,7	87	42,1	12,8	345,6	69,3
3,13	580,8	107	82,6	9,1	933,6	132,9
6,25	581,4	124,7	105,9	15	2.704,5	650,9
12,5	782,6	179,9	179,2	21,9	3.608	635,2
25	829	135,2	247,1	41	4.480,6	726,4

(continuación)

[GA] mg/ml	IP-10 pg/ml $\pm$ Dev. Std.		I-TAC pg/ml $\pm$ Dev. Std.		MIG pg/ml $\pm$ Dev. Std.	
50	2.150,8	840,1	532,6	129,4	13.771,2	5.694
100	12.865,1	1.839,5	2.444	238,4	45.353,3	8.983,7
200	10.899	1.933,7	2.091,2	250,9	37.897,5	8.052,1
400	6.111,3	976,7	1.560,5	220,8	27.574,5	4.725,5

Resumen

Este ejemplo muestra que la inducción mediada por acetato de glatiramer de citocinas, por ej., las quimiocinas IP-10, MIG e I-TAC, como respuesta a la estimulación de la citocina pro-inflamatoria IFN- γ se puede usar para evaluar la actividad (por ej., una o más de: potencia, pureza, estabilidad en el tiempo, actividad biológica o equivalencia para un estándar de referencia) de acetato de glatiramer. En general, una muestra con una mejora mayor dentro de un análisis comparativo se correlaciona con mayor potencia o estabilidad.

La mejora mediada por acetato de glatiramer de secreción de IP-10, MIG e I-TAC en presencia de IFN- γ es un resultado inesperado. Estos cuatro factores solubles se asocian típicamente a una respuesta de las citocinas pro-inflamatorias Th1 y se piensa que el acetato de glatiramer actúa, en parte, disminuyendo una respuesta de Th1 y activando una respuesta de Th2.

El mecanismo de acción preciso de acetato de glatiramer es complejo y aún no completamente entendido pero los métodos presentes proporcionan una manera de medir en una preparación de copolímero de muestra la actividad, potencia, estabilidad, especificidad (por ej., para equivalencia a COPAXONE® o equivalencia a un intervalo de especificación farmacéutica) de un ensayo o preparación de copolímero candidato.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar una propiedad de acetato de glatiramer, comprendiendo el método:

(a) proporcionar al menos una célula mieloide;

5 (b) poner en contacto al menos una célula mieloide con una cantidad de acetato de glatiramer e IFN- γ a una concentración y un periodo de tiempo suficiente para inducir que la célula exprese una o más proteínas inducidas por IFN- γ seleccionadas del grupo que consiste en: proteína 10 inducible por interferón- γ (IP-10), quimioatrayente- α de células T inducible con interferón (I-TAC) y monocina inducida por interferón- γ (MIG) y

10 (c) detectar la proteína inducida seleccionada del grupo que consiste en: proteína 10 inducible por interferón- γ (IP-10), quimioatrayente- α de células T inducible con interferón (I-TAC) y monocina inducida por interferón- γ (MIG) para evaluar una propiedad de acetato de glatiramer.

2. Un método para evaluar acetato de glatiramer, comprendiendo el método:

(a) proporcionar al menos una célula mieloide que es capaz de expresión de una proteína que es inducida por IFN- γ seleccionada del grupo que consiste en: proteína 10 inducible por interferón- γ (IP-10), quimioatrayente- α de células T inducible con interferón (I-TAC) y monocina inducida por interferón- γ (MIG);

15 (b) poner en contacto al menos una célula mieloide con una cantidad de acetato de glatiramer e IFN- γ a una concentración y durante un periodo de tiempo suficiente para inducir que la célula exprese la proteína inducida;

(c) medir la expresión, secreción, inducción, presencia o nivel de la proteína inducida seleccionada del grupo que consiste en: proteína 10 inducible por interferón- γ (IP-10), quimioatrayente- α de células T inducible con interferón (I-TAC) y monocina inducida por interferón- γ (MIG) y

20 (d) comparar la expresión, secreción, inducción, presencia o nivel, medido, de la proteína inducida con un valor de referencia, un perfil de inducción de citocinas o una especificación farmacéutica para una preparación farmacéutica del mercado de acetato de glatiramer para evaluar una propiedad de acetato de glatiramer.

25 3. El método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa (d) de comparar un valor para la producción, secreción, inducción, presencia o nivel de una o más proteínas inducidas por IFN- γ con un valor de referencia, un perfil de inducción de citocinas o una especificación farmacéutica para una preparación farmacéutica comercializada de acetato de glatiramer.

30 4. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que el valor de referencia, el perfil de inducción de citocinas o la propiedad de especificación farmacéutica para la preparación farmacéutica comercializada de acetato de glatiramer es un valor que corresponde a una propiedad seleccionada del grupo que consiste en: potencia, especificidad, estabilidad, actividad y combinaciones de las mismas.

35 5. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la concentración de IFN- γ en la etapa (b) induce la expresión de una o más proteínas inducidas por IFN- γ a un nivel mayor que la suma de: i) la expresión de una o más proteínas inducidas por IFN- γ cuando la célula se pone en contacto con acetato de glatiramer en ausencia de IFN- γ y ii) la expresión de una o más proteínas inducidas por IFN- γ cuando la célula se pone en contacto con IFN- γ en ausencia de acetato de glatiramer.

6. El método según la reivindicación 5, en el que la concentración de IFN- γ está entre 0,01 ng/ml y 100 ng/ml, entre 1 ng/ml y 50 ng/ml o 10 ng/ml.

7. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el periodo de tiempo es entre 1 hora y 48 horas, entre 6 horas y 36 horas o entre 12 horas y 24 horas.

40 8. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la concentración del acetato de glatiramer está entre 0,5 μ g/ml y 100 μ g/ml, IFN- γ está presente a entre 1 ng/ml y 50 ng/ml y el periodo de tiempo es entre 12 horas y 24 horas y las células son células THP-I.

9. Un método de preparación de una composición farmacéutica de acetato de glatiramer, comprendiendo el método:

(a) proporcionar un lote de acetato de glatiramer;

45 (b) evaluar una propiedad del lote según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y

(c) determinar que el lote es aceptable para uso farmacéutico si el nivel de una o más proteínas inducidas por IFN- γ iguala a un valor de referencia para acetato de glatiramer.

10. El método según la reivindicación 9, en el que el valor de referencia es un perfil de inducción de citocinas,

intervalo de equivalencia o especificación farmacéutica para potencia, especificidad, estabilidad y/o actividad biológica para una preparación farmacéutica comercializada de acetato de glatiramer.

11. Un método para evaluar la actividad, potencia, especificidad o estabilidad de una preparación de acetato de glatiramer, comprendiendo el método:

5 (a) proporcionar una célula mieloide;

(b) poner en contacto la célula con:

(i) una cantidad de acetato de glatiramer e

10 (ii) IFN- γ , a una concentración y un periodo de tiempo suficiente para inducir que la célula exprese una proteína inducida por IFN- γ seleccionada del grupo que consiste en: proteína 10 inducible por interferón- γ (IP-10), quimioatrayente- α de células T inducible con interferón (I-TAC) y monocina inducida por interferón- γ (MIG) y

(c) comparar la presencia, el nivel, la producción, secreción, inducción de la proteína inducida por IFN- γ con un valor de referencia para acetato de glatiramer.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la proteína inducida por IFN- γ es IP-10.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la proteína inducida por IFN- γ es I-TAC.

15 14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la proteína inducida por IFN- γ es MIG.

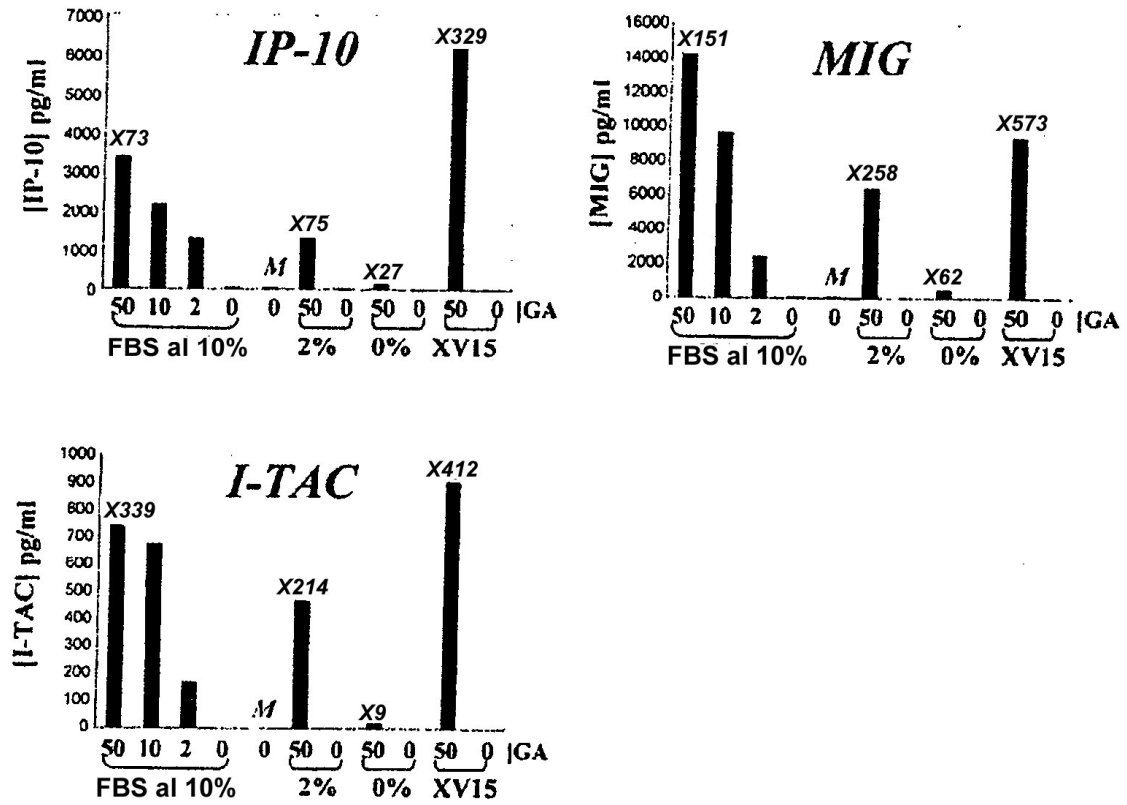


FIGURA 1