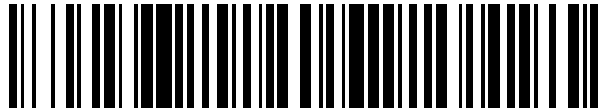


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 258**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 31/00 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2007 E 07852953 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2089428**

54 Título: **Anticuerpos cristalinos anti-hTNF alfa**

30 Prioridad:

27.10.2006 US 855104 P

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

10.02.2014

73 Titular/es:

**ABBVIE BIOTECHNOLOGY LTD (100.0%)
Clarendon House, 2, Church Street
HM 11 Hamilton, BM**

72 Inventor/es:

**BORHANI, DAVID W.;
FRAUNHOFER, WOLFGANG;
KRAUSE, HANS-JUERGEN;
KOENIGSDORFER, ANETTE;
WINTER, GERHARD y
GOTTSCHALK, STEFAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 442 258 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

Anticuerpos cristalinos anti-hTNF alfa

5 La presente invención se refiere a un método de cristalización discontinuo para cristalizar un anticuerpo anti-hTNF alfa que permita la producción de dicho anticuerpo a escala industrial; a los cristales de anticuerpo obtenidos de acuerdo con dicho método; a las composiciones que contienen dichos cristales así como a dichos cristales y composiciones para uso en medicina.

10 **Antecedentes técnicos**

a) Cristales de anticuerpo

15 Con más de 100 anticuerpos monoclonales siendo evaluados actualmente en fases de estudio clínico 2 o 3, el mercado de los mAb puede considerarse uno de los mercados biofarmacéuticos más prometedores. Como estos fármacos tienen que suministrarse en dosis individuales que a menudo exceden los 100 mg, hay una urgente necesidad de hallar estrategias adecuadas de formulación que satisfagan la estabilidad, la seguridad y la aceptación del paciente.

20 Sin embargo, las formulaciones líquidas de mAb altamente concentradas muestran viscosidad aumentada, lo que obstaculiza la capacidad de inyección a través de agujas delgadas apropiadas para el paciente. Además, la tendencia de agregación de las moléculas mAb a dichas altas concentraciones aumenta exponencialmente cuando se compara con soluciones moderadamente concentradas. Esto es inaceptable, en resumen, respecto a los requisitos de seguridad y estabilidad.

25 Por tanto, el suministro de elevadas dosis de mAb está restringido a grandes volúmenes, que generalmente tienen que suministrarse mediante infusión. Este modo de dosificación es muy costoso y reduce significativamente la aceptación del paciente.

30 Por lo tanto, serían altamente deseables suspensiones de cristales de mAb de bajo volumen farmacéuticamente aplicables para inyección subcutánea. Teóricamente, las vías de degradación que influyen en la integridad de los mAb deben desacelerarse significativamente debido a la rigidez de una red cristalina, donde los movimientos en la estructura proteica están impedidos. Además, puede esperarse que el aumento en la viscosidad se redujera significativamente cuando se comparan suspensiones cristalinas altamente concentradas con formulaciones líquidas. Con respecto a la liberación sostenida, puede ser posible generar o alterar cristales de proteínas en un modo que disuelvan lentamente cuando se sitúan en el cuerpo del paciente. Esto sería un modo muy elegante de suministrar una formulación de liberación sostenida, ya que el uso extensivo de excipientes y los procesos que dañan la estructura de los mAb se evitarían.

40 A pesar del enorme potencial en el uso de cristales de proteínas como sustancia de fármaco, se han hecho pocos intentos de evaluar sistemáticamente esta estrategia.

45 Una exención bien conocida es la insulina, que se cristalizó satisfactoriamente hace décadas. Hoy en día, el uso de suspensiones cristalinas de insulina está bien descrito, ofreciendo formulaciones estables y de larga acción que están bien establecidas en el mercado. La discrepancia entre el desarrollo de cristales de insulina y la cristalización de todas las demás proteínas puede estar relacionada con el hecho de que los agregados ordenados de insulina se forman de forma nativa en el páncreas. Por tanto, los cristales de insulina se obtienen fácilmente cuando la insulina se pone en contacto con un exceso de iones zinc. La mayoría de las demás proteínas tienden a formar precipitados no ordenados en lugar de cristales, y por lo tanto, hallar condiciones de cristalización para una proteína es una tarea no trivial que consume mucho tiempo.

50 A pesar del gran interés en recolectar cristales de proteínas para análisis de difracción por rayos x, la cuestión de hallar condiciones de cristalización adecuadas aún es una ciencia empírica, ya que en principio cualquier proteína se comporta de forma diferente. Hasta la fecha, no se ha hallado ninguna norma general que pudiera predecir de forma fiable mediante razonamiento solamente una condición de cristalización satisfactoria para una proteína de elección. Por tanto, obtener cristales de una proteína dada siempre se menciona como el "cuello de botella" de cualquier aplicación pretendida planeada después de ello.

60 Para hacer las cosas aún más desafiantes, los anticuerpos están descritos como especialmente difíciles de cristalizar, debido a la flexibilidad de la molécula.

65 No obstante, se conocen desde hace tiempo ejemplos de cristales de inmunoglobulina. El primer ejemplo de cristales de inmunoglobulina se describió hace 150 años por un médico inglés, Henry Bence Jones; aisló cristales de un dímero anormal de cadena ligera de Ig de la orina de un paciente con mieloma (Jones 1848). Dichas Ig anormales se han conocido desde entonces como proteínas de Bence Jones. En 1938, se describió la cristalización espontánea de una Ig anormal distinta del suero de un paciente con mieloma (von Bonsdorf, Groth et al. 1938),

aparentemente un oligómero de cadena pesada de Ig (PM 200 kDa). Se describieron inmunoglobulinas humanas cristalinas de estructura normal (dos cadenas pesadas ligadas a dos cadenas ligeras) durante los siguientes treinta años, de nuevo principalmente aisladas de pacientes con mieloma (Putnam 1955). Davies y sus colaboradores fueron los primeros en caracterizar la estructura de un anticuerpo de mieloma humano intacto, llamado "Dob", usando cristalografía de rayos x (Terry, Matthews et al. 1968), y determinaron su estructura tridimensional en 1971 (Sarma, Silverton et al. 1971). Su trabajo pionero fue seguido por el de otros, produciendo las estructuras cristalinas de la IgG "Kol" (Huber, Deisenhofer et al. 1976), la IgG "Mcg"(Rajan, Ely et al. 1983), y la IgG2a de linfoma canino (Harris, Larson et al. 1992).

Los cristales de inmunoglobulinas retienen sus actividades inmunológicas distintivas tras la redisolución. Nisonoff *et al.* informó en 1968 de un anticuerpo de conejo anti-p-azobenzoato, "X4", que se cristalizaba fácilmente. El anticuerpo X4 se caracterizó extensivamente antes de la cristalización así como después de la redisolución de los cristales. Se descubrió que [¹²⁵I]-p-yodobenzoato se unía específicamente y potentemente a X4 rediseñado; los cristales rediseñados también mostraban múltiples reacciones de inmunodifusión de Ouchterlony específicas típicas del suero de conejo no purificado (Nisonoff, Zappacosta et al. 1968). Connell y sus colaboradores describieron una inmunoglobulina gamma-1 kappa de mieloma humana (IgG-k), llamada "Tem", que cristalizaba espontáneamente del suero a temperaturas frías (Connell, Freedman et al. 1973). Se descubrió que los cristales de Tem se formaban bien y poseían simetría romboédrica. Se caracterizó extensivamente el suero que contenía Tem por técnicas de inmunodifusión en agarosa. La electroforesis y la inmunodifusión de una solución rediseñada de los cristales Tem demostraron que eran idénticos al material obtenido del suero por crioprecipitación, y a la proteína de mieloma aislada (Connell, Freedman et al. 1973).

Mills y sus colaboradores informaron en 1983 de una cristalocrioglobulinemia inusual resultante de anticuerpos monoclonales humanos contra albúmina (Mills, Brettman et al. 1983). Aquí, se aislaron cristales cuboides muy similares de dos pacientes. La redisolución de los cristales seguida por electroforesis e inmunoelectroforesis indicó que los cristales estaban compuestos por dos componentes proteicos, una IgG-lambda monoclonal y albúmina sérica humana en una proporción 1:2 (Jentoft, Dearborn et al. 1982). Los componentes se separaron a escala preparativa por disolución de los cristales originales seguida por cromatografía en columna. Aunque ningún componente separado cristalizaba por sí mismo, tras la recombinación se reformaba el complejo bipartito original y después cristalizaba. Un estudio adicional de las características de sedimentación distintivas y la reactividad inmunológica de la IgG separada rediseñada y su fragmento Fab con albúmina sérica humana indicó que la reasociación de los dos componentes separados rediseñados era de naturaleza inmunológica, es decir, que el anticuerpo cristalino una vez rediseñado aún poseía sus características de unión nativas, altamente específicas (por albúmina sérica humana) (Mills, Brettman et al. 1983).

Recientemente, Margolin y sus colaboradores informaron de los usos terapéuticos potenciales de anticuerpos cristalinos (Yang, Shenoy et al. 2003). Descubrieron que el anticuerpo monoclonal terapéutico trastuzumab (Herceptin®) podía cristalizarse (Shenoy, Govardhan et al. 2002). Las suspensiones de trastuzumab cristalino eran terapéuticamente eficaces en un modelo de tumor de ratón, demostrando de este modo la retención de la actividad biológica por trastuzumab cristalino (Yang, Shenoy et al. 2003).

b) Técnicas de cristalización

A diferencia de algunos otros esfuerzos científicos o de ingeniería, la cristalización de diversas proteínas no puede realizarse satisfactoriamente usando métodos o algoritmos definidos. Ciertamente, se han hecho grandes avances técnicos en los últimos 20-30 años, como indica el experto mundialmente conocido en cristalización de proteínas, A. McPherson. McPherson proporciona detalles extensivos sobre tácticas, estrategias, reactivos y dispositivos para la cristalización de macromoléculas. No proporciona, sin embargo, un método para asegurar que cualquier macromolécula pueda de hecho cristalizarse por un especialista en la técnica con expectativas razonables de éxito. McPherson indica por ejemplo: "Cualquiera que sea el procedimiento, no debe escatimarse ningún esfuerzo en refinar y optimizar los parámetros del sistema, tanto del solvente como del soluto, para estimular y promover interacciones de unión específicas entre moléculas y estabilizarlas una vez se han formado. Este último aspecto del problema generalmente depende de las propiedades químicas y físicas específicas de la proteína o ácido nucleico particular que se está cristalizando". (McPherson 1999, pág. 159)

Está ampliamente aceptado por los especialistas en la técnica de cristalización de proteínas que no existe ningún algoritmo para recoger una nueva proteína de interés, aplicar etapas de proceso definitivas, y obtener de este modo los cristales deseados.

Están disponibles en el mercado varios sistemas de cribado (por ejemplo Hampton 1 y 2, Wizzard I y II) que permiten, a escala de microlitros, explorar condiciones de cristalización potencialmente adecuadas para una proteína específica. Sin embargo, los resultados positivos obtenidos en dicho sistema de cribado no permiten necesariamente una cristalización satisfactoria a una escala discontinua industrialmente aplicable mayor. La conversión de los ensayos de cristalización en tamaño de microlitro a dimensiones industriales se describe como una tarea desafiante (véase Jen et al., 2001).

Baldock et al (1996) informaron sobre una comparación de microdifusión discontinua y difusión de vapor para la exploración inicial de condiciones de cristalización. Se exploraron seis proteínas disponibles en el mercado usando una serie de soluciones de cristalización. Las exploraciones se realizaron usando el método más común de difusión de vapor y tres variantes de un método de microcristalización discontinua, incluyendo una nueva técnica de evaporación. De las 58 condiciones de cristalización identificadas, 43 (74%) se identificaron por microdifusión discontinua, mientras que 41 (71%) se identificaron por difusión de vapor. Veintiséis condiciones se hallaron por ambos métodos, y 17 (29%) se habrían perdido sino se hubiera usado en absoluto la microdifusión discontinua. Esto muestra que la técnica de difusión de vapor, que es la más habitualmente usada en cribados de cristalización iniciales no garantiza resultados positivos.

c) Cristales de anticuerpo contra hTNF alfa

El TNF alfa humano (hTNF alfa) se considera un agente causante de numerosas enfermedades. Existe, por lo tanto, una gran necesidad de métodos adecuados para tratar dichos trastornos relacionados con hTNF alfa. Un enfoque terapéutico prometedor comprende la administración de dosis farmacéuticamente eficaces de anticuerpos anti-TNF humano. Recientemente, uno de dichos anticuerpos, denominado D2E7, o genéricamente adalimumab, se ha puesto en el mercado y se comercializa con el nombre comercial HUMIRA®.

El documento WO-A-02/072636 desvelaba la cristalización de los anticuerpos intactos completos Rituximab, Infliximab y Trastuzumab. La mayoría de los experimentos de cristalización se realizaron con agentes químicos con toxicidad incierta, como imidazol, 2-ciclohexil-etanosulfonato (CHES), metilpentanodiol, sulfato de cobre, y 2-morfolino-etanosulfonato (MES). La mayoría de los ejemplos usaban cristales de siembra para iniciar la cristalización.

El documento WO-A-2004/009776 desvelaba experimentos de cristalización a escala de microlitros usando la técnica de difusión de vapor por gota sedente mezclando volúmenes iguales (1 μ l) de diferentes tampones de cristalización y los fragmentos F(ab)₂ o Fab de D2E7. Aunque se informaron de varias condiciones experimentales para cada uno de dichos fragmentos, no se informó de cristalización satisfactoria del anticuerpo de D2E7 intacto completo.

Por lo tanto no están disponibles métodos para preparar cristales de cualquier anticuerpo completo anti-TNF humano dado, en particular de D2E7.

El problema a resolver de acuerdo con la presente invención es, por lo tanto, desarrollar condiciones de cristalización discontinua adecuadas para anticuerpos anti-hTNF alfa, en particular para el anticuerpo anti-hTNF alfa humano D2E7, y establecer condiciones de proceso de cristalización aplicables a volúmenes relevantes para producción industrial de cristales de anticuerpo. Al mismo tiempo, debe establecerse un proceso de cristalización que no haga uso de agentes tóxicos, que pudieran afectar negativamente a la aplicabilidad farmacéutica de dichos anticuerpos.

Sumario de la invención:

El problema mencionado anteriormente se resolvió, sorprendentemente, mediante el hallazgo de que es posible obtener cristales de un anticuerpo anti-hTNF alfa completo en volúmenes de cristalización discontinua por encima de escala de microlitros aplicando sales de fosfato inorgánico fisiológicamente aceptables como agente inductor de la cristalización.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método de cristalización discontinuo para cristalizar un anticuerpo IgG humano anti-hTNF alfa, comprendiendo el método las etapas de:

- a) proporcionar una solución acuosa del anticuerpo en mezcla con una sal de fosfato inorgánico para obtener una mezcla de cristalización acuosa, donde la mezcla de cristalización acuosa tiene una concentración de sal de fosfato inorgánico de 1 M a 6 M; y
- b) incubar la mezcla de cristalización acuosa hasta que se formen cristales del anticuerpo,

donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.

El método de cristalización de la invención generalmente se realiza a un pH de dicha mezcla de cristalización acuosa en el intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente 5, en particular de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,5, o de aproximadamente 3,7 a aproximadamente 4,2.

Además, dicha mezcla de cristalización acuosa puede contener al menos un tampón. Dicho tampón puede, en particular, comprender un componente acetato como componente principal, especialmente una sal de metal alcalino, en particular, acetato sódico. Dicha sal se ajusta mediante la adición de un ácido, en particular ácido acético, al pH

requerido. En una realización preferida del método de cristalización, la concentración del tampón (acetato total) en dicha mezcla de cristalización acuosa es de 0 a aproximadamente 0,5 M, o de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,5 M, como por ejemplo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,3 M, o de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,2 M.

En una realización particular adicional del método de cristalización de acuerdo con la invención, la sal de fosfato usada como agente de precipitación se selecciona entre sales de hidrogenofosfato, tales como sales de mono o dihidrogenofosfato, en particular una sal de amonio o una sal de metal alcalino, por ejemplo una sal que contiene iones Na^+ o K^+ , o una mezcla de los mismos que comprende al menos dos sales diferentes. Ejemplos adecuados son:

NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, y mezclas de los mismos.

La concentración de la sal de fosfato en la mezcla de cristalización está en el intervalo de 1 a 6 M, por ejemplo un intervalo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 4,0 M, o de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0 M, o de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,8 M, o de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 2,6 M.

En una realización preferida de la invención, la solución de proteína y la solución de cristalización se combinan en una proporción de aproximadamente 1:1. Por tanto, las molaridades de los agentes tamponantes/agentes de cristalización en la solución de cristalización original son aproximadamente el doble de elevadas que en la mezcla de cristalización.

Típicamente, el método de cristalización se realiza en un volumen discontinuo en el intervalo de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 20000 l, o de 1 ml a aproximadamente 15000 l, o de 1 ml a aproximadamente 12000 l, o de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10000 l, o de 1 ml a aproximadamente 6000 l, o de 1 ml a aproximadamente 3000 l, o de 1 ml a aproximadamente 1000 l, o de 1 ml a aproximadamente 100 l, como por ejemplo de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 8000 ml, o de aproximadamente 100 ml a aproximadamente 5000 ml, o de aproximadamente 1000 ml a aproximadamente 3000 ml; o de aproximadamente 1 l a aproximadamente 1000 l; o de aproximadamente 10 l a aproximadamente 500 l.

Además, el método de cristalización de la invención puede realizarse de modo que se consiga al menos una de las siguientes condiciones de cristalización adicionales:

- a) la incubación se realiza durante entre aproximadamente 1 hora a aproximadamente 60 días, por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 días, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 días;
- b) la incubación se realiza a una temperatura entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 50°C, por ejemplo entre aproximadamente 4°C y aproximadamente 37°C;
- c) la concentración de anticuerpo (es decir, concentración de proteína) en la mezcla de cristalización está en el intervalo de aproximadamente 1 a 200 mg/ml o de 1 a 100 mg/ml, por ejemplo 1,5 a 20 mg/ml, en particular en el intervalo de aproximadamente 2 a 15 mg/ml, o de 5 a 10 mg/ml. La concentración de proteína puede determinarse de acuerdo con procedimientos convencionales para la determinación de proteínas.

De acuerdo con un método particularmente preferido, la cristalización se realiza en las siguientes condiciones de la mezcla de cristalización:

Sal fosfato:	NaH_2PO_4 ,	1,5 a 2,5 M
Tampón:	acetato total,	0 a 0,3 M
pH:	3,6 a 4,2	
Concentración anti-hTNF alfa:	3 a 10 mg/ml	
Temperatura:	18 a 24°C	
Volumen discontinuo:	1 a 100 l	
Agitación:	ninguna	
Duración:	4 a 15 días	

Las mezclas de cristalización resumidas anteriormente habitualmente se obtienen añadiendo un agente de cristalización en solución o en forma de un sólido a la solución de proteína. Ambas soluciones pueden estar, pero no tienen que estarlo, tamponadas. La molaridad del agente de cristalización y la molaridad del tampón en la solución de cristalización original es habitualmente mayor que en la mezcla de cristalización ya que está "diluida" con la solución de proteína.

En una realización adicional, el método de cristalización de la invención puede comprender adicionalmente la etapa de secado de los cristales obtenidos. Los métodos de secado adecuados comprenden secado por evaporación, secado por pulverización, liofilización, secado al vacío, secado en lecho fluido, secado por congelación pulverizada, secado casi crítico, secado supercrítico, y secado con gas nitrógeno.

En una realización adicional, el método de cristalización de la invención puede comprender adicionalmente la etapa de intercambio de las aguas madres de cristalización con un tampón diferente, por ejemplo, un tampón que contenga polietilenglicol (PEG) con una masa molar en el intervalo de aproximadamente 300 a 800 Dalton o mezclas de PEG, por centrifugación, diafiltración, ultrafiltración u otras técnicas de intercambio de tampón habitualmente usadas.

La presente invención también se refiere a un cristal de un anticuerpo IgG humano intacto aislado anti-hTNF alfa, obtenible por un método de cristalización definido anteriormente donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.

Los cristales de la invención se caracterizan típicamente por una morfología tipo aguja con una longitud máxima l de aproximadamente 2 - 500 μm o de aproximadamente 100 - 300 μm y una proporción l/d de aproximadamente 3 a 30, pero también puede tener otros aspectos geométricos.

En particular, dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo no glucosilado.

En particular, el anticuerpo a cristalizar es un anticuerpo humano opcionalmente procesado adicionalmente para mejorar la unión a antígeno.

Dichos cristales se obtienen de un anticuerpo IgG tal como, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En particular, dicho anticuerpo es un anticuerpo completo anti-TNF alfa humano del grupo IgG1.

Dichos cristales se preparan a partir de un anticuerpo humano IgG intacto aislado con una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.

Los más preferidos son cristales preparados a partir del anticuerpo D2E7, como se desvela en el documento WO-A-97/29131 o un equivalente funcional del mismo. Dicho anticuerpo se produce de forma recombinante en células de ovario de hámster chino y comprende una secuencia de cadena pesada de acuerdo con la SEC ID N° 6 y una secuencia de cadena ligera de acuerdo con la SEC ID N° 5.

En una realización adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica sólida, líquida o semisólida que comprende: (a) cristales de un anticuerpo anti-hTNF alfa definido en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, y (b) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable que mantenga de forma estable los cristales de anticuerpo.

Otro aspecto de esta invención se refiere a una composición farmacéutica sólida, líquida o semisólida que comprende: (a) cristales de un anticuerpo anti-hTNF alfa definidos en este documento, y (b) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable que encapsule o integre dichos cristales de anticuerpo. La composición puede comprender adicionalmente (c) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable que mantenga de forma estable los cristales de anticuerpo. Además, la encapsulación e integración puede aplicarse en conjunto.

En particular, dichas composiciones pueden tener una concentración de cristales de anticuerpo superiores a aproximadamente 1 mg/ml, en particular aproximadamente 200 mg/ml o más, por ejemplo de aproximadamente 200 a aproximadamente 600 mg/ml, o de aproximadamente 300 a aproximadamente a 500 mg/ml.

Dichos excipientes pueden comprender al menos un vehículo polimérico, opcionalmente biodegradable o al menos un vehículo oleoso o lipídico.

Dicho vehículo polimérico puede ser un polímero seleccionado entre uno o más del grupo que consiste en: poli (ácido acrílico), poli (cianoacrilatos), poli (aminoácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (β -hidroxibutirato), poli (caprolactona), poli (dioxanona); poli (etilenglicol), poli (hidroxipropil) metalcrlamida, poli (órgano) fosfaceno, poli (ortoésteres), poli (alcohol vinílico), poli (vinilpirrolidona), copolímeros de alquil vinil éter y anhídrido maleico, polioles pluronic, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glucaminoglucanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

Dicho aceite (o líquido oleoso) puede ser un aceite (o líquido oleoso) seleccionado entre uno o más del grupo que consiste en: aceite de almendra oleaginoso, aceite de maíz, aceite de algodón, oleato etílico, miristato isopropílico, palmitato isopropílico, aceite mineral, aceite mineral ligero, octildodecanol, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite pérsico, aceite de sésamo, aceite de soja, escualano, triglicéridos líquidos, ceras líquidas, alcoholes superiores.

Dicho vehículo lipídico puede ser un lípido seleccionado entre uno o más del grupo que consiste en: ácidos grasos y sales de ácidos grasos, alcoholes grasos, aminas grasas, mono, di, y triglicéridos de ácidos grasos, fosfolípidos,

glucolípidos, esteroides y ceras y sustancias similares relacionadas. Las ceras se clasifican adicionalmente en productos naturales y sintéticos. Los materiales naturales incluyen ceras obtenidas de fuentes vegetales, animales o minerales tales como cera de abejas, carnauba o cera montana. Los naftalenos clorados y polímeros etilénicos son ejemplos de productos de cera sintética.

5 En una realización preferida, dicha composición es una composición inyectable que comprende cristales de anticuerpo anti-hTNF alfa definidos anteriormente y que tienen una concentración de cristales de anticuerpo en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 400 o de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 mg/ml.

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una suspensión de cristales que comprende cristales de anticuerpo anti-hTNF alfa definidos anteriormente que tienen una concentración de cristales de anticuerpo superior a aproximadamente 100 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 150 a aproximadamente 600 mg/ml, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mg/ml.

15 Los cristales y composiciones de la presente invención puede usarse en un método para tratar a un mamífero que comprende la etapa de administrar al mamífero una cantidad eficaz de cristales de anticuerpo completo anti-hTNF alfa definidos anteriormente o una cantidad eficaz de la composición definida anteriormente. Preferiblemente, dicha composición se administra por vía parenteral, vía oral, o por inyección.

20 Además, los cristales de la presente invención pueden usarse en un método para tratar un trastorno relacionado con hTNF alfa en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cristales de anticuerpo definidos anteriormente.

25 En particular, dicho trastorno relacionado con hTNF alfa se selecciona entre:

30 una enfermedad autoinmune, en particular artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis y artritis gotosa, una alergia, esclerosis múltiple, diabetes autoinmune, uveítis autoinmune y síndrome nefrótico; una enfermedad infecciosa, rechazo de trasplante o enfermedad de injerto contra hospedador, neoplasia, trastorno pulmonar, trastorno intestinal, trastorno cardíaco, trastornos óseos inflamatorios, enfermedad de resorción ósea, hepatitis alcohólica, hepatitis vírica, hepatitis fulminante, alteraciones de la coagulación, quemaduras, lesión por reperusión, formación de queloides, formación de tejido cicatrizal, pirexia, enfermedad periodontal, obesidad y toxicidad por radiación; una espondiloartropatía, un trastorno pulmonar, un trastorno coronario, un trastorno metabólico, anemia, dolor, un trastorno hepático, un trastorno cutáneo, un trastorno de las uñas, o vasculitis, enfermedad de Behcet, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), fibrosis pulmonar idiopática (IPF), reestenosis, diabetes, anemia, dolor, un trastorno relacionado con la enfermedad de Crohn, artritis reumatoide juvenil (JRA), una infección por el virus de la hepatitis C, psoriasis, artritis psoriásica, psoriasis con placas crónicas, caquexia relacionada con la edad, enfermedad de Alzheimer, edema cerebral, lesión cerebral inflamatoria, síndrome de fatiga crónica, dermatomiositis, reacciones a fármacos, edema en y/o alrededor de la médula espinal, fiebres periódicas familiares, síndrome de Felty, fibrosis, glomerulonefritis (por ejemplo, glomerulonefritis posterior a estreptococos o nefropatía por IgA), pérdida de prótesis, poliangiítis microscópica, trastorno de tejido conectivo mixto, mieloma múltiple, cáncer y caquexia, trastorno orgánico múltiple, síndrome mielodisplásico, orquitis, osteólisis, pancreatitis, incluyendo abscesos agudos, crónicos y pancreáticos, enfermedad periodontal, polimiositis, fallo renal progresivo, pseudogota, pioderma gangrenoso, policondritis recidivante, enfermedad cardíaca reumática, sarcoidosis, colangitis esclerosante, apoplejía, reparación de aneurisma aórtico toracoabdominal (TAAA), síndrome periódico asociado al receptor de TNF (TRAPS), síntomas relacionados con vacunación de fiebre amarilla, enfermedades inflamatorias asociadas con el oído, inflamación crónica del oído, o inflamación pediátrica del oído, uveítis, ciática, prostatitis, endometriosis, neovascularización coroidal, lupus, síndrome de Sjogren, y degeneración macular húmeda.

50 Además, la presente invención se refiere al uso de cristales de anticuerpo completo anti-hTNF alfa definidos anteriormente para preparar una composición farmacéutica para tratar una enfermedad relacionada con hTNF alfa como se ha definido anteriormente.

55 Finalmente, la presente invención proporciona cristales de anticuerpo anti-hTNF alfa definidos anteriormente para su uso en medicina.

Descripción de las Figuras

60 **Fig. 1:** Cristales de D2E7 del Ejemplo 37 después de 6 días.

Fig. 2: Cristales de D2E7 fabricados en volumen discontinuo de 1 ml, temperatura ambiente.

65 **Fig. 3:** Cristales de D2E7 fabricados en volumen discontinuo de 50 ml, temperatura ambiente.

Fig. 4: Cristales de D2E7 fabricados en volumen discontinuo de 10 l, temperatura ambiente.

Fig. 5: Cristales de D2E7 fabricados de acuerdo con la invención y birrefringencia de los mismos.

5 **Fig. 6:** Suspensiones de cristales de D2E7 a diferentes concentraciones inyectadas mediante agujas de diferente calibre.

Fig. 7: Análisis FT-IR de la suspensión de cristales de D2E7.

10 Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

15 Un "método discontinuo de cristalización" comprende la etapa de añadir la solución de cristalización que comprende el agente de cristalización, preferiblemente en forma disuelta, a la solución del anticuerpo a cristalizar.

20 Un "método de cristalización a micro escala", que puede basarse, por ejemplo, en difusión de vapor, comprende las etapas de mezclar un pequeño volumen de solución de anticuerpo en el intervalo de microlitros con un tampón de reserva que contiene un agente de cristalización; colocar una gotita de dicha mezcla en un recipiente sellado adyacente a una alícuota de dicho tampón de reserva; permitir el intercambio de disolvente entre la gotita y la reserva por difusión de vapor, durante los cual el contenido de disolvente en dicha gotita cambia y puede observarse cristalización si se alcanzan las condiciones de cristalización adecuadas.

25 Un "agente de cristalización", en el presente caso una sal de fosfato, favorece la formación de cristales del anticuerpo a cristalizar.

30 Una "solución de cristalización" contiene dicho agente de cristalización en forma disuelta. Preferiblemente, dicha solución es un sistema acuosa, es decir, los constituyentes líquidos de la misma constan predominantemente de agua. Como por ejemplo, del 80 al 100% en peso o del 95 al 100% en peso o del 98 al 100% en peso puede ser agua.

35 Los "cristales" de anticuerpo son una forma del estado sólido de la materia de dicha proteína, que es distinta de una segunda forma sólida, es decir, el estado amorfo, que existe esencialmente como un sólido heterogéneo no organizado. Los cristales tienen una estructura tridimensional regular, típicamente mencionada como red cristalina. Un cristal de anticuerpo comprende una serie tridimensional regular de moléculas de anticuerpo. Véase, Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª ed., pág. 1-16, Oxford University Press, Nueva York (1999).

40 Un anticuerpo anti-hTNF alfa "completo" o "intacto" cristalizado de acuerdo con esta invención, es un anticuerpo funcional que es capaz de reconocer y unirse a su antígeno TNF alfa humano in vitro y/o in vivo. El anticuerpo puede iniciar las posteriores reacciones del sistema inmune de un paciente asociadas con la unión del anticuerpo a su antígeno, en particular citotoxicidad directa, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). La molécula de anticuerpo tiene una estructura compuesta por dos cadenas pesadas idénticas (PM cada una de aproximadamente 50 kDa) unidas covalentemente entre sí, y dos cadenas ligeras idénticas (PM cada una de aproximadamente 25 kDa), cada una unida covalentemente a una de las cadenas pesadas. Las cuatro cadenas están dispuestas en un motivo de "Y" clásico. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones flanqueantes (FR). Cada VH y VL está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La molécula completa del anticuerpo tiene dos sitios de unión a antígeno, es decir, es "bivalente". Los dos sitios de unión a antígeno son específicos para un antígeno hTNF alfa, es decir, el anticuerpo es "mono-específico".

60 Los "anticuerpos monoclonales" son anticuerpos que se obtienen de un único clon de linfocitos B (células B), y reconocen el mismo determinante antigénico. Los anticuerpos monoclonales completos son aquellos que tienen la estructura molecular clásica mencionada anteriormente que incluye dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas. Los anticuerpos monoclonales se producen de forma rutinaria fusionando la célula B productora de anticuerpo con una célula de mieloma inmortal para generar hibridomas de células B, que producen continuamente anticuerpos monoclonales en cultivo celular. Están disponibles otros métodos de producción, como por ejemplo la expresión de anticuerpos monoclonales en cultivo celular bacteriano, de levaduras, de insecto, o de mamífero usando tecnología de presentación en fagos; la producción in vivo en animales modificados genéticamente, tales como vacas, cabras, cerdos, conejos, gallinas, o en ratones transgénicos que se han

modificado para contener y expresar el genoma completo de células B humanas; o la producción en plantas modificadas genéticamente, tales como tabaco y maíz. Los anticuerpos anti-hTNF alfa de todas estas fuentes pueden cristalizarse de acuerdo con esta invención.

5 Un "anticuerpo humano" o "anticuerpo completamente humano" es uno que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o que se produce de forma recombinante. La expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos aminoacídicos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular la CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias flanqueantes humanas.

15 La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en este documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante introducido por transfección en una célula hospedadora, anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, L.D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y ajuste de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, cuando derivan de o están relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal del anticuerpo humano *in vivo*.

30 Un "anticuerpo neutralizante", como se usa en este documento (o un "anticuerpo que neutraliza la actividad hTNF alfa"), pretende hacer referencia a un anticuerpo cuya unión a hTNF alfa provoca la inhibición de la actividad biológica de hTNF alfa. Esta inhibición de la actividad biológica de hTNF alfa puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de hTNF alfa, tal como la citotoxicidad inducida por hTNF alfa (*in vitro* o *in vivo*), la activación celular inducida por hTNF alfa y la unión de hTNF alfa a receptores de hTNF alfa. Estos indicadores de la actividad biológica de hTNF alfa pueden evaluarse por uno o más de varios ensayos convencionales *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica. Preferiblemente, la capacidad de un anticuerpo de neutralizar la actividad hTNF alfa se evalúa por inhibición de la citotoxicidad inducida por hTNF alfa de células L929. Como parámetro adicional o alternativo de la actividad hTNF alfa, puede evaluarse la capacidad de un anticuerpo de inhibir la expresión inducida pro hTNF alfa de ELAM-1 sobre HUVEC, como una medición de la activación celular inducida por hTNF alfa.

45 Un anticuerpo anti-hTNF alfa "de afinidad madurada" es uno con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables, que provocan una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con el anticuerpo precursor. Los anticuerpos de afinidad madurada tendrán valores de afinidad nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen por procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración de la afinidad por reordenamiento del dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de restos de la CDR y/o región flanqueante se describe por: Barbas et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Scier et al., Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al., J. Mol Biol. 226:889-896 (1992).

55 Un "anticuerpo aislado", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hTNF alfa está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes a hTNF alfa). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hTNF alfa puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas hTNF alfa de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro materia celular y/o agentes químicos.

60 La expresión "TNF alfa humano" (abreviado en este documento como hTNF alfa, o simplemente hTNF), como se usa en este documento, pretende hacer referencia a una citoquina humana que existe como una forma secretada de 17 kDa y una forma asociada a membrana de 26 kDa, cuya forma biológicamente activa está compuesta por un trímero de moléculas unidas no covalentemente. La estructura de hTNF alfa se describe adicionalmente en, por ejemplo, Pennica, D., et al. (1984) Nature 312:724-729; Davis, J.M., et al. (1987) Biochemistry 26:1322-1326; y Jones, E.Y., et al. (1989) Nature 338:225-228. La expresión TNF alfa humano pretende incluir TNF humano recombinante (rhTNF alfa), que puede prepararse por métodos convencionales de expresión recombinante o

adquirirse en el mercado (R & D Systems, Catálogo N°. 210-TA, Minneapolis, MN).

El término " k_{off} ", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

5 El término " k_d ", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

10 Un "equivalente funcional" de un anticuerpo anti-hTNF alfa "precursor" específico cristalizado de acuerdo con la invención es uno que muestra la misma especificidad de antígeno, difiere sin embargo con respecto a la composición molecular del anticuerpo "precursor" a nivel de aminoácidos o nivel de glucosilación. Dichas diferencias, sin embargo, pueden ser simplemente aquellas que las condiciones de cristalización no desvían de los intervalos de los parámetros desvelados en este documento.

15 "Encapsulación" de cristal de anticuerpo se refiere a una formulación donde los cristales incorporados están individualmente recubiertos por al menos una capa de un material de recubrimiento. En una realización preferida, dichos cristales recubiertos pueden tener una velocidad de disolución sostenida.

20 "Integración" de cristales de anticuerpo se refiere a una formulación donde los cristales, que pueden estar encapsulados o no, se incorporan en un vehículo sólido, líquido o semisólido de un modo disperso. Dichas moléculas de anticuerpo cristalizado integradas pueden liberarse o disolverse de un modo controlado, sostenido del vehículo.

25 B. Método de cristalización

El método de cristalización de la invención es en principio aplicable a cualquier anticuerpo IgG intacto anti-hTNF alfa aislado desvelado anteriormente. Dicho anticuerpo puede estar en forma glucosilada o no glucosilada. En particular, el método es aplicable a D2E7 y equivalentes funcionales del mismo.

30 El anticuerpo humano IgG anti-hTNF alfa es un anticuerpo IgG, en particular un anticuerpo humano anti-TNF alfa humano del grupo IgG1.

35 Salvo que se indique de otro modo, el método de cristalización de la invención hace uso de equipo técnico, agentes químicos y metodologías bien conocidos en la técnica. Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, la presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que la selección de condiciones de cristalización específicas, en particular, la selección de agentes de cristalización específicos, opcionalmente combinados adicionalmente con condiciones de pH específicas y/o intervalos de concentración de los agentes correspondientes (tampón, anticuerpo, agente de cristalización), permite por primera vez preparar de forma reproducible y a gran escala cristales estables de anticuerpos, en particular anticuerpos humanos no quiméricos, dirigidos contra hTNF

40 alfa, que pueden procesarse adicionalmente para formar un ingrediente activo de una composición farmacéutica superior altamente ventajosa.

45 El material de partida para realizar el método de cristalización normalmente comprende una solución concentrada del anticuerpo a cristalizar. La concentración de proteína puede estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 5 a 75 mg/ml. Dicha solución puede contener aditivos que estabilicen dicho anticuerpo disuelto, y puede ser conveniente retirar dichos aditivos por anticipado. Esto puede conseguirse realizando una etapa de intercambio de tampón.

50 Preferiblemente, dicho material de partida para realizar la cristalización contiene el anticuerpo en una solución acuosa, que tiene un pH ajustado en el intervalo de aproximadamente 3,2 a 8,2, o de aproximadamente 4,0 a 8,0, en particular de aproximadamente 4,5 a 6,5, preferiblemente alrededor de 5,0 a 5,5. El pH puede ajustarse mediante un tampón adecuado aplicado en una concentración final de aproximadamente 1 a 50 mM, en particular de aproximadamente 1 a 10 mM. La solución puede contener aditivos, como por ejemplo en una proporción de aproximadamente 0,01 al 15, o del 0,1 al 5, o del 0,1 al 2% en peso en base al peso total de la solución, como sales, azúcares, alcoholes de azúcar y tensioactivos, para estabilizar adicionalmente la solución. Los excipientes deben seleccionarse preferiblemente entre compuestos fisiológicamente aceptables, rutinariamente aplicados en preparaciones farmacéuticas. Como ejemplos no limitantes pueden mencionarse sales, como NaCl; tensioactivos, como polisorbato 80 /Tween 80), polisorbato 20 (Tween 20); azúcares, como sacarosa, trehalosa; alcoholes de azúcar, como manitol, sorbitol; y agentes tamponantes, como sistemas tamponantes basados en fosfato, como

55 tampones de hidrógeno fosfato sódico y potásico como se ha definido anteriormente, tampón acetato, tampón fosfato, tampón citrato, tampón TRIS, tampón maleato o tampón succinato, tampón histidina; aminoácidos, como histidina, arginina y glicina.

60 El intercambio de tampón puede realizarse mediante métodos rutinarios, por ejemplo diálisis o ultrafiltración.

65

La concentración inicial de proteína de la solución acuosa usada como material de partida debe estar en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 200 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/ml.

5 Dependiendo del tamaño final pretendido del lote (que puede estar en el intervalo de 1 ml a 20000 (veinte mil) litros) se coloca un volumen inicial de dicha solución acuosa de anticuerpo en un recipiente apropiado (como por ejemplo un vaso, frasco o tanque) hecho de material inerte, como por ejemplo vidrio, polímero o metal. El volumen inicial de dicha solución acuosa puede corresponder a aproximadamente el 30 al 80%, normalmente aproximadamente el 50% del tamaño final del lote.

10 Si fuera necesario, la solución después de haberse cargado en dicho recipiente se llevará a condiciones normalizadas. En particular, la temperatura se ajustará en el intervalo de aproximadamente 4°C y aproximadamente 37°C.

15 Entonces la solución de cristalización, que contiene el agente de cristalización en una concentración apropiada, opcionalmente pre-condicionado del mismo modo que la solución de anticuerpo, se añade a la solución de anticuerpo.

20 La adición de la solución de cristalización se realiza de forma continua o discontinua opcionalmente con agitación suave para facilitar la mezcla de los dos líquidos. Preferiblemente, la adición se realiza en condiciones en que la solución de proteínas se proporciona en agitación y la solución de cristalización (o agentes en su forma sólida) se añade de un modo controlado.

25 La formación de los cristales de anticuerpo se inicia aplicando una sal de fosfato, en particular una sal de hidrógeno fosfato, y preferiblemente una sal de metal alcalino, o una mezcla de al menos dos sales diferentes de metal alcalino como se ha definido anteriormente como agente de cristalización. La solución de cristalización contiene el agente en una concentración que es suficiente para producir una concentración final de la sal de fosfato en dicha mezcla de cristalización en el intervalo de 1 a 6 M.

30 Preferiblemente, la solución de cristalización contiene adicionalmente un tampón ácido, es decir, diferente del de la solución de anticuerpo, en una concentración adecuada para permitir el ajuste del pH de la mezcla de cristalización en el intervalo de aproximadamente 3 a 5.

35 Después de haber acabado la adición de dicha solución de cristalización, la mezcla obtenida de este modo puede incubarse adicionalmente durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 60 días para obtener un rendimiento máximo de cristales de anticuerpo. Si fuera apropiado, la mezcla puede, por ejemplo, agitarse, agitarse suavemente, balancearse o moverse de un modo conocido por se.

40 Finalmente, los cristales obtenidos pueden separarse por métodos conocidos, por ejemplo filtración o centrifugación, como por ejemplo por centrifugación a aproximadamente 200 - 20000 rpm, preferiblemente 500 - 2000 rpm, a temperatura ambiente o 4°C. Las aguas madre restantes pueden desecharse o procesarse adicionalmente.

45 Si fuera necesario, los cristales aislados de este modo pueden lavarse y posteriormente secarse, o las aguas madre pueden intercambiarse por un sistema disolvente diferente adecuado para almacenamiento y/o uso final de los anticuerpos suspendidos en el mismo.

50 Los cristales de anticuerpo formados de acuerdo con la presente invención pueden variar en su forma. Las formas típicamente pueden incluir agujas, tipo cono, esféricas y formas tipo erizo de mar. El tamaño de los cristales puede ser del orden de mayor de nm a tamaño mm (como por ejemplo longitud). En algunas realizaciones, los cristales son de al menos aproximadamente 10 µm de tamaño, y pueden ser visibles a simple vista. Para administración terapéutica, el tamaño de los cristales variará dependiendo de la vía de administración, por ejemplo, para administración subcutánea el tamaño de los cristales puede ser mayor que para administración intravenosa.

55 La forma de los cristales puede alterarse añadiendo aditivos adicionales específicos a la mezcla de cristalización, como se ha descrito previamente para cristales de proteína y también para cristales de moléculas orgánicas e inorgánicas de bajo peso molecular.

60 Si fuera necesario, puede verificarse que los cristales son de hecho cristales de dicho anticuerpo. Los cristales de un anticuerpo pueden analizarse microscópicamente por birrefringencia. En general, los cristales, salvo los de simetría interna cúbica, rotarán el plano de polarización de luz polarizada. En otro método más, los cristales pueden aislarse, lavarse, re-solubilizarse y analizarse por SDS-PAGE y, opcionalmente, teñirse con un anticuerpo anti-receptor de Fc. Opcionalmente, el anticuerpo re-solubilizado también puede ensayarse para la unión a su hTNF alfa utilizando ensayos convencionales.

65 Los cristales obtenidos de acuerdo con la invención también pueden entrecruzarse entre sí. Dicho entrecruzamiento puede potenciar la estabilidad de los cristales. Los métodos para entrecruzar cristales se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 5.849.296. Los cristales pueden entrecruzarse usando un reactivo bifuncional tal

como glutaraldeído. Una vez entrecruzados, los cristales pueden liofilizarse y almacenarse para su uso, por ejemplo, en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas.

5 En algunos casos, puede ser deseable secar el cristal. Los cristales pueden secarse mediante gases inertes, como gas nitrógeno, secado en horno de vacío, liofilización, evaporación, secado en bandeja, secado en lecho fluido, secado por pulverización, secado por vacío o secado por rotación. Los métodos adecuados son bien conocidos.

10 Los cristales formados de acuerdo con la invención pueden mantenerse en la solución de cristalización original, o pueden lavarse y combinarse con otras sustancias, como vehículos inertes o ingredientes para formar composiciones o formulaciones que comprendan cristales de la invención. Dichas composiciones o formulaciones pueden usarse, por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

15 Una realización preferida es combinar un vehículo o ingrediente adecuado con cristales de la invención de tal modo que los cristales de la formulación se integren o encapsulen por un excipiente. Los vehículos adecuados pueden cogerse del grupo no limitante de: poli (ácido acrílico), poli (cianoacrilatos), poli (aminoácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (β -hidroxibutirato), poli (caprolactona), poli (dioxanona); poli (etilenglicol), poli (hidroxipropil) metalcrilamida, poli (órgano) fosfaceno, poli (ortoésteres), poli (alcohol vinílico), poli (vinilpirrolidona), copolímeros de alquil vinil éter y anhídrido maleico, polioles pluronic, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glucaminoglucanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos, SAIB, ácidos grasos y sales de ácidos grasos, alcoholes grasos, aminas grasas, mono, di, y triglicéridos de ácidos grasos, fosfolípidos, glucolípidos, esteroides y ceras y sustancias similares relacionadas. Las ceras se clasifican adicionalmente en productos naturales y sintéticos. Los materiales naturales incluyen ceras obtenidas de fuentes vegetales, animales o minerales tales como cera de abejas, carnauba o cera montana. Los naftalenos clorados y polímeros etilénicos son ejemplos de productos de cera sintética.

25

C. Composiciones

30 Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones/formulaciones que comprenden cristales de anticuerpo anti-hTNF alfa de la invención en combinación con al menos un vehículo/excipiente.

Las formulaciones pueden ser sólidas, semisólidas o líquidas.

35 Las formulaciones de la invención se preparan, en una forma adecuada para almacenamiento y/o para su uso, mezclando el anticuerpo que tiene el grado necesario de pureza con un aditivo fisiológicamente aceptable, como vehículo, excipiente y/o estabilizante (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed., Osol, A. Ed. (1980)), en forma de suspensiones, liofilizados o secados de otro modo. Opcionalmente también pueden incorporarse ingredientes activos adicionales, como por ejemplo diferentes anticuerpos, biomoléculas, moléculas de bajo peso molecular sintetizadas de forma química o enzimática.

40 Los aditivos aceptables son no tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Ejemplos no limitantes de los mismos incluyen:

45 - Agentes acidificantes, como ácido acético, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido clorhídrico, ácido málico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido fosfórico diluido, ácido sulfúrico, ácido tartárico.

- Propulsores de aerosol, como butano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetano, isobutano, propano, tricloromonofluorometano.

50 - Desplazantes del aire, como dióxido de carbono, nitrógeno;

- Alcoholes desnaturalizados, como metil isobutil cetona, octacetato de sacarosa.

55 - Agentes alcalinizantes, como solución de amoniaco, carbonato de amonio, dietanolamina, diisopropanolamina, hidróxido potásico, bicarbonato sódico, borato sódico, carbonato sódico, hidróxido sódico, trolamina;

- Agentes antiespumantes, como dimeticona, simeticona.

60 - Conservantes antimicrobianos, como cloruro de benzalconio, solución de cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, butilparabeno, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, clorocresol, cresol, ácido deshidoacético, etilparabeno, metilparabeno, metilparabeno sódico, fenol, alcohol feniletílico, acetato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, beozoato potásico, sorbato potásico, propilparabeno, propilparabeno sódico, benzoato sódico, deshidoacetato sódico, propionato sódico, ácido sórbico, timerosal, timol.

65 - Antioxidantes, como ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado,

ES 2 442 258 T3

- ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, sulfoxilato de formaldehído sódico, metabisulfito sódico, tiosulfato sódico, dióxido de azufre, tocoferol, excipientes de tocoferol;
- 5 - Agentes tamponantes, como ácido acético, carbonato de amonio, fosfato de amonio, ácido bórico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fosfórico, citrato potásico, metafosfato potásico, fosfato potásico monobásico, acetato sódico, citrato sódico, solución de lactato sódico, fosfato sódico dibásico, fosfato sódico monobásico, histidina.
 - Agentes quelantes, como edetato disódico, ácido etilendiaminatetraacético y sales, ácido edético;
 - 10 - Agentes de recubrimiento, como carboximetilcelulosa sódica, acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, etilcelulosa, gelatina, barniz farmacéutico, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa, copolímero de ácido metacrílico, metilcelulosa, polietilenglicol, acetato ftalato de polivinilo, goma laca, sacarosa, dióxido de titanio, cera de carnauba, cera microcristalina, ceína, poliaminoácidos, otros polímeros como PLGA etc., y SAIB.
 - 15 - Agentes colorantes, como óxido férrico.
 - Agentes de formación de complejos, como ácido etilendiaminatetraacético y sales (EDTA), ácido edético, etanolamida del ácido gentsísico, sulfato de oxiquinolína.
 - 20 - Desecantes, como cloruro de calcio, sulfato de calcio, dióxido de silicio.
 - Agentes emulsionantes y/o solubilizantes, como goma arábica, colesterol, dietanolamina (adjuvante), monoestearato de glicerilo, alcoholes de lanolina, lecitina, mono y diglicéridos, monoetanolamina (adjuvante), ácido oleico (adjuvante), alcohol oleico (estabilizante), poloxamero, estearato de polioxietileno 50, aceite de ricino de polioxilo 35, aceite de ricino hidrogenado de polioxilo 40, oleil éter de polioxilo 10, cetostearil éter de polioxilo 20, estearato de polioxilo 40, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, diacetato de propilenglicol, monoestearato de propilenglicol, lauril sulfato sódico, estearato sódico, monolaureato de sorbitán, monooleato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, ácido esteárico, trolamina, cera emulsionante.
 - 25 - Auxiliares de filtración, como celulosa en polvo, tierra silíceo purificada.
 - Aromas y perfumes, como anetol, benzaldehído, etil vainillina, mentol, salicilato de metilo, glutamato monosódico, aceite de flor de naranjo, hierbabuena, aceite de hierbabuena, alcohol de hierbabuena, aceite de rosa, agua de rosa fuerte, timol, tintura de bálsamo de tolu, vainilla, tintura de vainilla, vainillina.
 - Agentes emolientes y/o anticoagulantes, como silicato de calcio, silicato de magnesio, dióxido de silicio coloidal, talco.
 - 40 - Humectantes, como glicerina, hexilenglicol, propilenglicol, sorbitol;
 - Bases de pomada, lanolina, lanolina anhidra, pomada hidrófila, pomada blanca, pomada amarilla, pomada de polietilenglicol, vaselina, vaselina hidrófila, vaselina blanca, pomada de agua de rosa, escualano.
 - 45 - Plastificantes, como aceite de ricino, lanolina, aceite mineral, vaselina, bencil benil formiato, clorobutanol, dietil ftalato, sorbitol, monoglicéridos diacetilados, dietil ftalatos, glicerina, glicerol, monoglicéridos mono y diacetilados, polietilenglicol, propilenglicol, triacetina, citrato de trietilo, etanol.
 - 50 - Polipéptidos, como los de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos);
 - Proteínas, tales como albumina sérica, gelatina o inmunoglobulinas.
 - Membranas poliméricas, como membranas de acetato de celulosa.
 - 55 - Disolventes, como acetona, alcohol, alcohol diluido, hidrato de amileno, benzoato de benzilo, alcohol butílico, tetracloruro de carbono, cloroformo, aceite de maíz, aceite de algodón, acetato de etilo, glicerina, hexilenglicol, alcohol isopropílico, alcohol metílico, cloruro de metileno, metil isobutil cetona, aceite mineral, aceite de cacahuete, polietilenglicol, carbonato de propileno, propilenglicol, aceite de sésamo, agua para inyección, agua estéril para inyección, agua estéril para irrigación, agua purificada, triglicéridos líquidos, ceras líquidas, alcoholes superiores.
 - 60 - Adsorbentes, como celulosa en polvo, carbono vegetal, tierra silíceo purificada, adsorbentes de dióxido de carbono, cal de hidróxido de bario, cal de sosa.
 - 65

ES 2 442 258 T3

- Agentes endurecedores, como aceite de ricino hidrogenado, alcohol cetosteárico, alcohol cetílico, cera de ésteres cetílicos, grasa dura, parafina, excipiente de polietileno, alcohol estearílico, cera emulsionante, cera blanca, cera amarilla.
 - 5 - Bases de supositorio, como manteca de cacao, grasa dura, polietilenglicol;
 - Agentes de suspensión y/o que aumentan la viscosidad, como goma arábiga, agar, ácido algínico, monoestearato de aluminio, bentonita, bentonita purificada, bentonita magma, carbómero 934p, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio, carboximetilcelulosa de sodio 12, carragenina, 10 celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica, dextrina, gelatina, goma guar, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, silicato de magnesio y aluminio, metilcelulosa, pectina, óxido de polietileno, alcohol polivinílico, povidona, alginato de propilenglicol, dióxido de silicio, dióxido de silicio coloidal, alginato sódico, tragacanto, goma santana;
 - 15 - Agentes edulcorantes, como aspartamo, dextratos, dextrosa, excipiente de dextrosa, fructosa, manitol, sacarina, sacarina de calcio, sacarina sódica, sorbitol, solución de sorbitol, sacarosa, azúcar comestible, azúcar de confitería, jarabe;
 - Aglutinantes de comprimidos, como goma arábiga, ácido algínico, carboximetilcelulosa sódica, celulosa 20 microcristalina, dextrina, etilcelulosa, gelatina, glucosa líquida, goma guar, hidroxipropil metilcelulosa, metilcelulosa, óxido de polietileno, povidona, almidón pre-gelatinizado, jarabe.
 - Diluyentes de comprimidos y/o cápsulas, como carbonato de calcio, fosfato cálcico dibásico, fosfato cálcico 25 tribásico, sulfato cálcico, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, dextrina, excipiente de dextrosa, fructosa, caolín, lactosa, manitol, sorbitol, almidón, almidón pre-gelatinizado, sacarosa, azúcar comprimible, azúcar de confitería;
 - Disgregantes de comprimido, como ácido algínico, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, 30 crospovidona, polacrilina de potasio, almidón glicolato sódico, almidón, almidón pre-gelatinizado.
 - Lubricantes de comprimidos y/o cápsulas, como estearato de calcio, behenato de glicerilo, estearato de 35 magnesio, aceite mineral ligero, polietilenglicol, estearil fumarato sódico, ácido esteárico, ácido esteárico purificado, talco, aceite vegetal hidrogenado, estearato de zinc;
 - 35 - Agente de tonicidad, como dextrosa, glicerina, manitol, cloruro de potasio, cloruro sódico.
 - Vehículo: elixir aromatizado y/o edulcorado, elixir de compuesto benzaldehído, elixir iso-alcohólico, agua de 40 hierbabuena, solución de sorbitol, jarabe, jarabe de bálsamo tolu.
 - 40 - Vehículos, como aceite de almendra oleaginosa, aceite de maíz, aceite de algodón, oleato de etilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, aceite mineral, aceite mineral ligero, alcohol miristílico, octildodecanol, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite pérsico, aceite de sésamo, aceite de soja, escualano; esferas de azúcar como vehículo sólido; agua bacteriostática estéril para inyección, inyección de cloruro sódico bacteriostático, 45 triglicéridos líquidos, ceras líquidas, alcoholes superiores.
 - Agentes que repelen el agua, como ciclometicona, dimeticona, simeticona;
 - Agentes humectantes y/o solubilizantes, como cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, cloruro de 50 cetilpiridinio, docusato sódico, nonoxinol 9, nonoxinol 10, octoxinol 9, poloxamero, aceite de ricino de polioxilo 35, polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado, estearato de polioxilo 50, oleil éter de polioxilo 10, polioxilo 20, cetosteáril éter, estearato de polioxilo 40, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, lauril sulfato sódico, monolaureato de sorbitán, monooleato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, tiloxapol;
- 55 Los cristales pueden combinarse con un vehículo polimérico para proporcionar estabilidad y/o liberación sostenida. Dichos polímeros incluyen polímeros biocompatibles y biodegradables. Un vehículo polimérico puede ser un único tipo de polímero o puede estar compuesto por una mezcla de tipos de polímeros. Ejemplos no limitantes de vehículos poliméricos ya se han indicado anteriormente.
- 60 Ejemplos de ingredientes o excipientes preferidos incluyen:
 - sales de aminoácidos tales como glicina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, asparagina, glutamina, prolina, histidina;
 - monosacáridos, tales como glucosa, fructosa, galactosa, manosa, arabinosa, xilosa, ribosa;
 - 65 - disacáridos, tales como lactosa, trehalosa, maltosa, sacarosa;
 - polisacáridos, tales como maltodextrinas, dextranos, almidón, glucógeno;

- alditoles, tales como manitol, xilitol, lactitol, sorbitol;
- ácido glucurónico, ácido galacturónico;
- ciclodextrinas, tales como metil ciclodextrina, hidroxipropil-(3-ciclodextrina)
- 5 - sales inorgánicas, tales como cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro de magnesio, fosfatos de sodio y potasio, carbonato amónico del ácido bórico y fosfato de amonio;
- sales orgánicas, tales como acetatos, citrato, ascorbato, lactato;
- agentes emulsionantes o solubilizantes tales como goma arábiga, dietanolamina, monoestearato de glicerilo, lecitina, monoetanolamina, ácido oleico, alcohol oleílico, poloxámero, polisorbatos, lauril sulfato sódico, ácido esteárico, monolaurato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, y otros derivados de sorbitán, derivados de polioxilo, cera, derivados de polioxietileno, derivados de sorbitán; y
- 10 - reactivos que aumentan la viscosidad como agar, ácido algínico y sus sales, goma guar, pectina, alcohol polivinílico, oxido de polietileno, celulosa y sus derivados, carbonato de propileno, propilenglicol, hexilenglicol y tiloxapol.

15 Las formulaciones descritas en este documento también comprenden una cantidad eficaz de anticuerpo cristalino. En particular, las formulaciones de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de cristales de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de los cristales de anticuerpo puede variar de

20 acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en que cualquier efecto toxico o nocivo del anticuerpo se supera por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como se usa una dosis profiláctica en

25 sujetos antes de o en una fase temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Las dosificaciones adecuadas pueden determinarse fácilmente usando metodología convencional. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo de los factores

30 mencionados anteriormente, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, como por ejemplo 0,1-20 mg/kg de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones diferentes, o por infusión continua. Una dosificación diaria o semanal típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 20 mg/kg o más, dependiendo de la afección, y el tratamiento se repite hasta que sucede una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles

35 otros regímenes de dosificación. En algunos casos, las formulaciones comprenden una concentración de anticuerpo de al menos aproximadamente 1 g/l o más cuando se resolubiliza. En otras realizaciones, la concentración de anticuerpo es de al menos aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 100 g/l cuando se resolubiliza.

Los cristales de un anticuerpo, o formulaciones que comprenden dichos cristales, pueden administrarse solos o

40 como parte de una preparación farmacéutica. Pueden administrarse por vía parenteral, oral o tópica. Por ejemplo, pueden administrarse por vía oral, pulmonar, nasal, aural, anal, dérmica, ocular, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, a la mucosa, sublingual, subcutánea, transdérmica, tópica o intracraneal, o al interior de la cavidad bucal. Ejemplos específicos de técnicas de administración comprenden inhalación pulmonar, aplicación

45 intralesional, inyección con aguja, inhalación de polvo seco, electroporación cutánea, suministro en aerosol y tecnologías de inyección sin aguja, incluyendo administración subcutánea sin aguja.

La presente invención se explicará ahora en más detalle mediante los siguientes ejemplos ilustrativos no limitantes. Guiado por la parte general de la descripción y en base a sus conocimientos generales, un lector experto estará

50 posibilitado para proporcionar realizaciones adicionales a la invención sin experimentación excesiva.

Parte experimental

A. Materiales

55 a) Proteína

El anticuerpo monoclonal (mAb) D2E7 congelado se obtuvo de Abbott Laboratories. Todos los experimentos se realizaron a partir de un lote de producto de fármaco donde la concentración original de mAb era de 50 mg/ml.

60 b) Agentes químicos puros

El acetato sódico se obtuvo de Grüssing GmbH, Filsum. Los polietilenglicoles de diferentes grados de polimerización se obtuvieron de Clariant GmbH, Sulzbach. Además, se usaron tamices y reactivos comerciales de cristalización (Hampton Research, Nextal Biotechnologies) para ciertos experimentos a microescala. Todos los demás agentes

65 químicos fueron de Sigma-Aldrich, Steinheim, o Merck, Darmstadt.

B. Métodos generales

a) Descongelación de la sustancia de fármaco D2E7

5 El D2E7 se descongeló a 25°C en baños de agua agitada.

b) Intercambio de tampón - método A

10 Se pipeteó una alícuota de solución de D2E7 en un concentrador Vivaspin 20 (Vivascience) de 30 KDa de MWCO. La muestra de proteína se diluyó con el nuevo tampón en una proporción de 1:10, y por centrifugación a 5.000 x g a 4°C (centrífuga Sigma 4 K 15 lab) el volumen de muestra se llevó de nuevo al volumen de muestra original. Las etapas de dilución/centrifugación se repitieron una vez, provocando una dilución de 1:100 del tampón de muestra original. Después de ajustar la concentración de proteína, la solución se filtró a esterilizada a través de una unidad de filtración accionada por jeringa de 0,2 µm.

15

b) Intercambio de tampón - método B

20 Se puso una alícuota de solución de D2E7 en un casete de diálisis SLIDE-A-LYZER (Pierce Biotechnology Inc.). El casete de diálisis se puso en un vaso que contenía el tampón de elección, y el intercambio de tampón se realizó a 4°C durante una noche con agitación. Después de ajustar la concentración de proteína, la solución se filtró a esterilidad a través de una unidad de filtración accionada por jeringa de 0,2 µm.

c) DO280 - mediciones de la concentración de proteína

25 Se usó un dispositivo ThermoSpectronics UV1 para evaluar la concentración de proteína a una longitud de onda de 280 nm, aplicando un coeficiente de extinción de 1,39 cm² mg⁻¹. Para este fin, se centrifugaron alícuotas de las suspensiones de cristalización a 14.000 rpm, y se determinó la concentración de proteína residual en el sobrenadante.

30 d) Mediciones de pH

Las mediciones de pH se realizaron usando un medidor de pH Mettler Toledo MP220. Se utilizaron electrodos Inlab 413 y microelectrodos Inlab 423.

35 e) Métodos de cristalización

e1) Cristalización a microescala - Difusión de vapor por gota sedente Hydra II

40 Se realizaron cribados iniciales de cristalización usando un robot de cristalización Hydra II y placas de 96 pocillos Greiner (tres pocillos de gota, Hampton Research). Después de preparar las placas, se sellaron los pocillos con película Clearseal (Hampton Research).

e2) Cristalización a microescala - Difusión de vapor por gota colgante

45 Los experimentos de difusión de vapor por gota colgante se realizaron usando placas VDX (con sellante, Hampton Research) y cubreobjetos de plástico OptiClear (cuadrados, Hampton Research) o cubreobjetos de vidrio siliconizados (circulares, Hampton Research), respectivamente. Después de la preparación de soluciones de reserva, se mezcló una gota de la solución de reserva con una gota de la solución de proteína sobre un cubreobjetos, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido de modo que la gota estuviera colgando por encima de la reserva.

50

e3) Cristalización discontinua - método A (placa de 24 pocillos)

55 La cristalización discontinua se realizó mezclando la solución de proteína con una cantidad igual de tampón de cristalización (500 µl) en un pocillo. El pocillo posteriormente se selló con cinta adhesiva para evitar la evaporación del agua.

e4) Cristalización discontinua - método B (tubo de reacción Eppendorff)

60 La cristalización discontinua se realizó mezclando la solución de proteína con una cantidad igual de tampón de cristalización en un tubo de reacción Eppendorff de 1,5 ml o 2 ml.

e5) Cristalización discontinua - método C (tubos Falcon, agitación)

65 La cristalización discontinua se realizó mezclando la solución de proteína con una cantidad igual de tampón de cristalización en un tubo Falcon de 50 ml. Justo después de cerrarlo, el tubo se puso en un agitador de laboratorio

(GFL 3013 o GFL 3015) o como alternativa se agitó por volteo. Mediante la aplicación de estos métodos, se evitó la introducción de mezcladores en la muestra.

e6) Cristalización discontinua - método D (recipiente de polipropileno de 1 litro)

La cristalización discontinua se realizó mezclando la solución de proteína con una cantidad igual de tampón de cristalización en un frasco de polipropileno de 1 litro esterilizado. Justo después de cerrarlo, el recipiente se almacenó a temperatura ambiente sin agitación. Mediante la aplicación de este método, se evitó la introducción de mezcladores en la muestra.

f) SDS-PAGE

Las muestras se prepararon ajustando la concentración de proteína a 8 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$. Las muestras se diluyeron con un tampón SDS/Tris/Glicerina que contenía azul de bromofenol.

El análisis cuantitativo de SDS PAGE se realizó usando geles de Bis-Tris al 10% Invitrogen NuPage, tampón de procesamiento NuPage MES SDS y patrones de proteína de amplio rango Mark12. Se pipetearon 20 μl de muestra en un pocillo del gel. Después de procesar el gel y la fijación con reactivo ácido acético/metanol, se realizó la tinción usando el kit de tinción con azul coloidal Novex. Los geles se secaron usando solución de secado Invitrogen Gel-Dry.

g) Microscopía óptica

Los cristales se observaron usando un microscopio Zeiss Axiovert 25 o Nikon Labophot. El último estaba equipado con un conjunto de filtros de polarización y una videocámara a color JVC TK C1380.

h) SE-HPLC

Los niveles de agregación de las muestras de D2E7 se evaluaron por SE-HPLC. Se usaron una bomba Dionex P680, un tomamuestras automático ASI-100 y un dispositivo detector UVD170U. Las especies agregadas se separaron del monómero mediante una columna de filtración en gel Amersham Bioscience Superose 6 10/300 GL, aplicando un protocolo convencional de Abbott validado (CL16-PS-02, pureza de Adalimumab).

C. Experimentos de cristalización por difusión de vapor

Los valores de concentración dados en los siguientes ejemplos son valores iniciales que se refieren a la solución de anticuerpo y la solución de reserva antes de mezclar las dos soluciones.

Todos los valores de pH, si no se describen de otro modo, se refieren al pH de una solución madre de tampón acetato antes de combinarse con otras sustancias, como el agente de cristalización.

Todas las molaridades de tampón, si no se describen de otro modo, se refieren a las concentraciones de acetato sódico en una solución madre antes del ajuste del pH, típicamente realizado usando ácido acético glacial.

Ejemplo 1 - Tamiz de rejilla de PEG 4.000/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante

El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,2. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μl de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución de PEG 4.000 al 50% p/v y agua Milli Q (completamente desalada y opcionalmente predestilada) en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y el PEG 4.000 se varió de aproximadamente el 6% p/v a aproximadamente el 28% p/v en etapas de un 2%. El pH fue de aproximadamente 5,2 todo el tiempo. Cada condición se evaluó por duplicado. Se mezcló aproximadamente 1 μl de solución de proteína con aproximadamente 1 μl de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante los siguientes treinta días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

RESULTADOS: De los 24 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 2 - Tamiz de rejilla de PEG 4.000/acetato sódico modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente concentración de proteína

El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,2. La concentración de proteína se ajustó a 50 mg/ml. Excepto por la concentración de proteína, las condiciones del proceso fueron idénticas a las del Ejemplo 1.

5 **RESULTADOS:** De los 24 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 3 - Tamiz de rejilla de PEG 400/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante

10 El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,2. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

15 Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μ l de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución de PEG 400 al 50% p/v y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y el PEG 400 se varió de aproximadamente el 30% p/v a aproximadamente el 40% p/v en etapas de un 2%. El pH fue de aproximadamente 5,2 todo el tiempo. Cada condición se evaluó por duplicado. Se mezcló aproximadamente 1 μ l de solución de proteína con aproximadamente 1 μ l de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante los siguientes treinta días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

RESULTADOS: De los 12 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

25 **Ejemplo 4 - Tamiz de rejilla de PEG 400/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente concentración de proteína**

30 El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,2. La concentración de proteína se ajustó a 50 mg/ml. Excepto por la concentración de proteína, las condiciones del proceso fueron idénticas a las del Ejemplo 3.

RESULTADOS: De los 12 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 5 - Tamiz de rejilla de PEG 10.000/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante

35 El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,2. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

40 Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μ l de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución de PEG 400 al 50% p/v y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y el PEG 10.000 se varió de aproximadamente el 4% p/v a aproximadamente el 14% p/v en etapas de un 2%. El pH fue de aproximadamente 5,2 todo el tiempo. Cada condición se evaluó por duplicado. Se mezcló aproximadamente 1 μ l de solución de proteína con aproximadamente 1 μ l de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante los siguientes treinta días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

50 **RESULTADOS:** De los 12 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 6 - Tamiz de rejilla de PEG 10.000/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente concentración de proteína

55 El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,2. La concentración de proteína se ajustó de 45 a 55 mg/ml, preferiblemente a 50 mg/ml. Excepto por la concentración de proteína, las condiciones del proceso fueron idénticas a las del Ejemplo 5.

RESULTADOS: De los 12 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

60 **Ejemplo 7 - Tamiz de rejilla de PEG 400/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente preparación**

65 El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,2. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μl de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución de PEG 10.000 al 50% p/v y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y el PEG 400 fue de aproximadamente el 32% p/v y de aproximadamente el 34% p/v. El pH fue de aproximadamente 4,2, 4,7, 5,2, 5,7, 6,2 o 6,7. Cada condición se evaluó por duplicado. Se mezcló aproximadamente 1 μl de solución de proteína con aproximadamente 1 μl de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante los siguientes treinta días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

RESULTADOS: De los 24 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 8 - Tamiz de rejilla de PEG 400/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente concentración de proteína y preparación

El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,2. La concentración de proteína se ajustó a 50 mg/ml. Excepto por la concentración de proteína, las condiciones del proceso fueron idénticas a las del Ejemplo 7.

RESULTADOS: De los 24 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 9 - Tamiz de rejilla de PEG 400/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente preparación

El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,2. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μl de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución de PEG 400 al 50% p/v y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se usó a aproximadamente 0,025 M, 0,05 M, 0,075 M, 0,15 M, 0,2 M o 0,25 M. El PEG 400 se varió de aproximadamente el 32% p/v a aproximadamente el 34% p/v. El pH fue de aproximadamente 5,7 o 4,2. Cada condición se evaluó por duplicado. Se mezcló aproximadamente 1 μl de solución de proteína con aproximadamente 1 μl de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante los siguientes treinta días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

RESULTADOS: De los 48 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 10 - Tamiz de rejilla de PEG 400/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente preparación

El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,2. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μl de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución de PEG 400 al 50% p/v y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se usó a aproximadamente 0,025 M, 0,05 M o 0,1 M. El PEG 400 fue de aproximadamente el 28% p/v o de aproximadamente el 30% p/v. El pH fue de aproximadamente 5,2, 5,7, 6,2 o 6,7. Cada condición se evaluó por duplicado. Se mezcló aproximadamente 1 μl de solución de proteína con aproximadamente 1 μl de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante los siguientes treinta días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

RESULTADOS: De los 48 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 11 - Tamiz de rejilla de PEG 400 combinado con PEG 4.000/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante

El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,2. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μl de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución de PEG 4.000 al 50% p/v y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y el PEG 4.000 se varió de aproximadamente el 4% p/v a aproximadamente el 8% p/v en etapas de un 2%. Simultáneamente, se añadió PEG 400 a las soluciones de PEG 4.000/acetato a concentraciones de aproximadamente el 24% p/v, 26% p/v, 28% p/v o 30% p/v. El pH fue de aproximadamente 5,2 todo el tiempo. Cada condición se evaluó por duplicado. Se mezcló aproximadamente 1 μl de solución de proteína con aproximadamente 1 μl de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante los siguientes treinta días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

RESULTADOS: De los 24 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 12 - Tamiz de rejilla de PEG 400 combinado con PEG 4.000/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente preparación

El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,2. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μl de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución de PEG 4.000 al 50% p/v y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y el PEG 4.000 se varió de aproximadamente el 4% p/v a aproximadamente el 8% p/v en etapas de un 2%. Simultáneamente, se añadió PEG 400 a las soluciones de PEG 4.000/acetato a concentraciones de aproximadamente el 30% p/v, 32% p/v, 34% p/v o 36% p/v. El pH fue de aproximadamente 4,2 todo el tiempo. Cada condición se evaluó por duplicado. Se mezcló aproximadamente 1 μl de solución de proteína con aproximadamente 1 μl de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante los siguientes treinta días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

RESULTADOS: De los 24 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 13 - Tamiz de rejilla de PEG 4.000/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente preparación

El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5 o 4,0. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μl de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución de PEG 4.000 al 50% p/v y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y el PEG 4.000 se varió de aproximadamente el 4% p/v a aproximadamente el 26% p/v en etapas de un 2%. El pH del tampón acetato usado fue el mismo que el del tampón de proteína correspondiente. Cada condición se evaluó por duplicado. Se mezcló aproximadamente 1 μl de solución de proteína con aproximadamente 1 μl de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante los siguientes treinta días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

RESULTADOS: De los 144 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 14 - Tamiz de rejilla de PEG 4.000/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente preparación

Las condiciones experimentales fueron idénticas a las del Ejemplo 13, excepto por la molaridad del tampón acetato, que se mantuvo constante a aproximadamente 0,2 M (molaridad del tampón de precipitación)

RESULTADOS: De los 144 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 15 - Tamiz de rejilla de PEG 4.000/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente preparación

5 Las condiciones experimentales fueron idénticas a las del Ejemplo 13, excepto por la molaridad del tampón acetato que se mantuvo constante a 0,1 M (molaridad del tampón de precipitación).

RESULTADOS: De los 144 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

10 **Ejemplo 16 - Tamiz de rejilla de PEG 4.000/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente preparación**

Las condiciones experimentales fueron idénticas a las del Ejemplo 13, excepto por la molaridad del tampón acetato que se mantuvo constante a aproximadamente 0,4 M (molaridad del tampón de precipitación).

15 RESULTADOS: De los 144 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 17 - Experimentos a granel de PEG 4.000/acetato sódico

20 El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,5. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

25 Se pipetearon cuatro alícuotas de 500 μ l cada una en cuatro tubos de reacción Eppendorff. Se tituló una solución de PEG 4.000 al 24% en tampón acetato sódico 0,1 M a pH 5,5 frente a las soluciones de proteína hasta que la solución se volvió ligeramente opaca. Posteriormente, se pipeteó agua en las soluciones justo hasta que las soluciones se volvieron transparentes de nuevo. Este método se conoce como *cristalización a granel*. La titulación se realizó a temperatura ambiente para dos muestras y a 4°C para las otras dos muestras. Posteriormente, uno de cada par de muestras se almacenó a temperatura ambiente o a 4°C, respectivamente. La microscopía de las alícuotas de 1 μ l de las muestras se realizó múltiples veces durante la siguiente semana.

30 RESULTADOS: De las cuatro muestras, ninguna dejó cristales.

Ejemplo 18 - Tamiz de rejilla de PEG 4.000/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente temperatura

35 Las condiciones experimentales fueron idénticas a las del Ejemplo 13. Sin embargo, los tubos se prepararon y almacenaron a 4°C.

RESULTADOS: De los 144 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

40 **Ejemplo 19 - Tamiz de rejilla de PEG 4.000/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente concentración de proteína**

45 Excepto por la concentración de proteína, que se ajustó a 5 mg/ml, las condiciones experimentales fueron idénticas a las del Ejemplo 13.

RESULTADOS: De los 144 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 20 - Tamiz de rejilla de sulfato de amonio/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante

50 El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,5. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

55 Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μ l de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución madre de sulfato de amonio y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y la concentración del sulfato de amonio se varió de 0,5 M a 2,5 M en etapas de 0,25 M. El pH del tampón acetato fue de aproximadamente 5,5 todo el tiempo. Cada condición se evaluó por duplicado. Se mezcló aproximadamente 1 μ l de solución de proteína con aproximadamente 1 μ l de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se prepararon y almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante las siguientes dos semanas. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

65

RESULTADOS: De los 18 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 21 - Tamiz de rejilla de cloruro sódico/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante

5 El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,5. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

10 Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μl de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución madre de cloruro sódico y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y la concentración del cloruro sódico se varió de 1,5 M a 2,5 M, variada en etapas de 0,5 M. El pH del tampón acetato fue de aproximadamente 5,5 todo el tiempo. Cada condición se evaluó por duplicado. Se mezcló aproximadamente 1 μl de solución de proteína con aproximadamente 1 μl de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se prepararon y almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante las siguientes dos semanas. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

20 RESULTADOS: De los 6 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 22 - Tamiz de rejilla de PEG 4.000/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, influencia de detergentes

25 El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,5. La concentración de proteína se ajustó a 5 mg/ml.

30 Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μl de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución de PEG 4.000 al 50% p/v y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y el PEG 4.000 se varió de aproximadamente el 10% p/v a aproximadamente el 20% p/v en etapas de un 2%. El pH del tampón acetato fue de aproximadamente 5,5 todo el tiempo. Además, se añadieron polisorbato 20, polisorbato 80 y Pluronic F 68 a cualquier tampón resultante descrito anteriormente a concentraciones del 0%, 0,02% y 0,1%, respectivamente. Se mezcló aproximadamente 1 μl de solución de proteína con aproximadamente 1 μl de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se prepararon y almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante las siguientes dos semanas. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

40 RESULTADOS: De los 84 pocillos evaluados, no se observaron cristales. No pudo observarse influencia de los detergentes evaluados sobre el comportamiento del sistema de cristalización.

Ejemplo 23 - Tamiz de rejilla de acetato de zinc/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante

45 El D2E7 se tamponó en un tampón que contenía acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 5,5. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

50 Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μl de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución madre de acetato de zinc y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y la concentración del acetato de zinc se varió de 0,1 M a 0,9 M en etapas de aproximadamente 0,2 M. El pH del tampón acetato fue de aproximadamente 5,5 todo el tiempo. Cada condición se evaluó por duplicado. Se mezcló aproximadamente 1 μl de solución de proteína con aproximadamente 1 μl de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se prepararon y almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante las siguientes dos semanas. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

60 RESULTADOS: De los 12 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 24 - Cribado amplio de condiciones de modo de difusión de vapor

El D2E7 se tamponó en un tampón HEPES 20 mM/cloruro sódico 150 mM a pH 7,4. La concentración de proteína se ajustó a 5 mg/ml, 10 mg/ml, o 20 mg/ml.

5 Usando el robot de cristalización Hydra II, se prepararon placas de 96 pocillos Greiner a temperatura ambiente, usando varios tamices de cristalización disponibles en el mercado. La solución de proteína y el agente de cristalización se mezclaron en una proporción de aproximadamente 1:1, preferiblemente 1:1.

10 Se usaron los siguientes tamices:

15 Tamiz Hampton Crystal 1 y 2 (Hampton Research),
 Tamiz Hampton Index (Hampton Research),
 Tamiz Hampton SaltRX (Hampton Research),
 Nextal The Classics, The Classics Lite, The PEGs, The Anions, The pH clear y The Ammonium sulfate (todos de Nextal Biotechnologies).

20 Después de la adición de proteína al agente de cristalización (tres gotas por condición, que contenían tres diferentes concentraciones de proteína como se ha descrito anteriormente), las placas se sellaron con película Clearseal. Cada placa se preparó por cuadruplicado y después se almacenaron a temperatura ambiente, 4°C, 27°C y 37°C, respectivamente. La microscopía de las gotas se realizó después de cinco días y doce días, respectivamente. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

25 **RESULTADOS:** De las 864 condiciones comerciales evaluadas, 2 dejaron cristales a concentraciones de proteína y temperaturas definidas a continuación, al menos después de dos semanas.

30 - acetato sódico anhidro 0,1 M pH 4,6, dihidrogenofosfato sódico 0,9 M, dihidrogenofosfato potásico 0,9 M (= Nextal The Anions, E3), 10 o 20 mg/ml, y 27°C, o 20 mg/ml y 37°C.

- Bis-Tris Propano 0,1 M pH 7,0, sulfato de amonio 1,5 M (= Hampton SaltRX, F2), 5, 10, o 20 mg/ml y 27°C.

Los cristales mostraron morfologías de tipo grupo de agujas.

35 Las siguientes condiciones de tamices disponibles en el mercado no dejaron cristales. Para composiciones detalladas de las soluciones, por favor remítase a www.hamptonresearch.com y www.nextalbiotech.com:

40 Tamiz Hampton Crystal 1 - todas las condiciones (48)
 Tamiz Hampton Crytsal 2 - todas las condiciones (48)
 Tamiz Hampton Index - todas las condiciones (96)
 Tamiz Hampton SaltRX - todas las condiciones a pesar de "F2" (95)
 Nextal - The Classics - todas las condiciones (96)
 Nextal - The Classics Lite - todas las condiciones (96)
 Nextal - The PEGs - todas las condiciones (96)
 45 Nextal - The Anions - todas las condiciones a pesar de "E3" (95)
 Nextal - The pH Clear - todas las condiciones (96)
 Nextal - The AmmoniumSulfate - todas las condiciones (96)

Ejemplo 25 - Tamiz de rejilla de PEG 4.000/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente preparación

El D2E7 se tamponó en un tampón HEPES 20 mM/cloruro sódico 150 mM a pH 7,4. La concentración de proteína se ajustó a 5 mg/ml, 10 mg/ml, o 20 mg/ml.

55 Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos circulares de vidrio siliconizado. Se prepararon 500 µl de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución de PEG 4.000 al 50% p/v y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y la concentración de PEG 4.000 se varió del 4% al 26% en etapas de un 2%. El pH fue de aproximadamente 5,5 todo el tiempo. Cada condición se preparó con las tres concentraciones de proteína como se ha descrito anteriormente. Se mezcló aproximadamente 1 µl de solución de proteína con aproximadamente 1 µl de una solución de reserva particular en un cubreobjetos circular de vidrio siliconizado, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó después de seis días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

65

RESULTADOS: De los 72 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 26 - Experimentos de difusión de vapor por gota colgante aplicando el tamiz de detergente Hampton

5 El D2E7 se tamponó en un tampón HEPES 20 mM/cloruro sódico 150 mM a pH 7,4. La concentración de proteína se ajustó a 5 mg/ml.

10 Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos circulares de vidrio siliconizado. Se prepararon 500 μ l de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución de PEG 4.000 al 50% p/v y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y la concentración de PEG 4.000 fue de aproximadamente el 12% p/v o el 14% p/v. El pH fue de aproximadamente 5,5 todo el tiempo. Se mezclaron aproximadamente 4 μ l de solución de proteína con aproximadamente 1 μ l de una solución detergente particular del tamiz Hampton en un cubreobjetos circular de vidrio siliconizado. La gota se mezcló posteriormente con 5 μ l de una solución de reserva particular, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó después de seis días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

20 **RESULTADOS:** De los 144 pocillos evaluados, no se observaron cristales.

Ejemplo 27 - Difusión de vapor por gota colgante usando tamiz Hampton de PEG/Ion

25 El D2E7 se tamponó en un tampón HEPES 20 mM/cloruro sódico 150 mM a pH 7,4. La concentración de proteína se ajustó a 5 mg/ml o 10 mg/ml.

30 Se usaron placas VDX engrasadas y cubreobjetos circulares de vidrio siliconizado. Se pipetearon 500 μ l de cada una de las 48 formulaciones de tampón en un pocillo y se mezclaron con 250 μ l de agua Milli Q, respectivamente. Se pipeteó aproximadamente 1 μ l de la muestra de proteína en un cubreobjetos y posteriormente se mezcló con aproximadamente 1 μ l de la solución de reserva de un pocillo particular. El pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante los siguientes siete días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

35 **RESULTADOS:** De las 96 condiciones ensayadas, no se observaron cristales.

Ejemplo 28 - Difusión de vapor por gota colgante usando tamiz Hampton de PEG/Ion, diferente preparación

40 El D2E7 se tamponó en un tampón HEPES 20 mM/cloruro sódico 150 mM a pH 7,4. La concentración de proteína se ajustó a 5 mg/ml.

45 Las condiciones experimentales fueron idénticas a las del Ejemplo 27 con la excepción de que se pipetearon 500 μ l de cada una de las 48 formulaciones de tampón en un pocillo y se mezclaron con 500 μ l de agua Milli Q, respectivamente.

RESULTADOS: De las 48 condiciones ensayadas, no se observaron cristales.

Ejemplo 29 - Difusión de vapor por gota colgante usando tamiz Hampton de baja fuerza iónica

50 El D2E7 se tamponó en un tampón HEPES 20 mM/cloruro sódico 150 mM a pH 7,4. La concentración de proteína se ajustó a 5 mg/ml.

55 Se usaron placas VDX engrasadas y cubreobjetos circulares de vidrio siliconizado. Se pipeteó 1 ml de solución deshidratante de PEG 3.350 al 24% p/v en 108 pocillos, respectivamente. Se pipetearon 2 μ l de muestra de proteína en un cubreobjetos y posteriormente se mezclaron con aproximadamente 1 μ l de uno de los 18 reactivos de tampón particulares. Después de ello, se añadieron aproximadamente 2,5 μ l de precipitante de PEG 3.350 de una de seis diferentes concentraciones a la gota. Los pocillos se sellaron con los cubreobjetos invertidos, generando 108 diferentes experimentos de gota colgante.

60 Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante los siguientes siete días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

RESULTADOS: De las 108 condiciones ensayadas, ninguna dejó cristales.

Ejemplo 30 - Tamiz de rejilla de sulfato de amonio/Bis-Tris propano en modo de difusión de vapor por gota colgante

5 El D2E7 se tamponó en un tampón HEPES 20 mM/cloruro sódico 150 mM a pH 7,4. La concentración de proteína se ajustó a 5 mg/ml, 10 mg/ml, o 20 mg/ml.

10 Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos circulares de vidrio siliconizado. Se prepararon 500 μ l de una solución de reserva particular mezclando solución madre de sulfato de amonio, solución madre de Bis-Tris propano y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del sulfato de amonio fue de aproximadamente 0,5 M, 1 M, 1,5 M o 2 M. La molaridad del Bis-Tris propano fue de 0,1 M todo el tiempo, y el pH del tampón de Bis-Tris propano fue de aproximadamente 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 u 8,0. Las 24 condiciones resultantes se evaluaron con las tres concentraciones de proteína como se ha descrito anteriormente, y con almacenamiento a temperatura ambiente o almacenamiento a aproximadamente 27°C, respectivamente. Se mezcló aproximadamente 1 μ l de solución de proteína con aproximadamente 1 μ l de una solución de reserva particular en un cubreobjetos circular de vidrio siliconizado, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó después de tres días. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

RESULTADOS: De las 144 condiciones ensayadas, ninguna dejó cristales después de tres días.

25 **Ejemplo 31 - Tamiz de rejilla de dihidrogenofosfato de sodio y potasio/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante**

El D2E7 se tamponó en un tampón HEPES 20 mM/cloruro sódico 150 mM a pH 7,4. La concentración de proteína se ajustó a 5 mg/ml, 10 mg/ml, o 20 mg/ml.

30 Se usaron una placa VDX engrasada y cubreobjetos cuadrados de plástico OptiClear. Se prepararon 500 μ l de una solución de reserva particular mezclando tampón acetato, solución madre de dihidrogenofosfato sódico, solución madre de dihidrogenofosfato potásico y agua Milli Q en cada pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato se mantuvo constante a aproximadamente 0,1 M, y el pH del tampón acetato fue de aproximadamente 4,1, 4,6, 5,1 o 5,6.

35 Se aplicaron las siguientes combinaciones de dihidrogenofosfato sódico y dihidrogenofosfato potásico:

- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 0,3 M y dihidrogenofosfato potásico aproximadamente 0,3 M;
- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 0,6 M y dihidrogenofosfato potásico aproximadamente 0,6 M;
- 40 - dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 0,9 M y dihidrogenofosfato potásico aproximadamente 0,9 M;
- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 1,8 M,
- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 2,1 M,
- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 2,4 M.

45 Cada condición se preparó con las tres concentraciones de proteína como se ha descrito anteriormente. Se mezcló aproximadamente 1 μ l de solución de proteína con aproximadamente 1 μ l de una solución de reserva particular en un cubreobjetos cuadrado de plástico OptiClear, y el pocillo se selló con el cubreobjetos invertido, generando un experimento de gota colgante. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las gotas se realizó múltiples veces durante el siguiente mes. Las condiciones se clasificaron en gotas transparentes, gotas que contienen precipitación aleatoria, gotas que contienen cristales y gotas que contienen mezclas de especies precipitadas y cristales.

RESULTADOS: De los 72 pocillos evaluados, los siguientes tampones de cristalización generaron cristales en forma de grupos de agujas:

- 55 - dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 0,9 M y dihidrogenofosfato potásico aproximadamente 0,9 M, a pH aproximadamente 4,1;
- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 1,8 M sin la sal de potasio, a pH aproximadamente 4,6.

60 Se obtuvieron cristales con estas condiciones a las tres concentraciones de proteína.

Ejemplo 32 - Tamiz de rejilla de dihidrogenofosfato de sodio y potasio/acetato sódico en modo de difusión de vapor por gota colgante, diferente temperatura

65 Las condiciones experimentales fueron idénticas a las del Ejemplo 31, excepto que la temperatura de

almacenamiento se aumentó hasta 30°C.

RESULTADOS: De los 72 pocillos evaluados, los siguientes tampones de cristalización generaron cristales en forma de grupos de agujas:

- 5 Concentración de proteína de aproximadamente 5 mg/ml:
- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 0,9 M y dihidrogenofosfato potásico aproximadamente 0,9 M a pH aproximadamente 4,1;
 - 10 - dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 1,8 M sin la sal de potasio, a pH aproximadamente 4,1,
 - dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 1,8 M sin la sal de potasio, a pH aproximadamente 4,6,
 - 15 - dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 1,8 M sin la sal de potasio, a pH aproximadamente 5,1.

Concentración de proteína de aproximadamente 10 mg/ml:

- 20 - dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 0,9 M y dihidrogenofosfato potásico aproximadamente 0,9 M, a pH aproximadamente 4,1,
- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 1,8 M sin la sal de potasio, a pH aproximadamente 4,6,
- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 1,8 M sin la sal de potasio, a pH aproximadamente 5,1.

Concentración de proteína de aproximadamente 20 mg/ml:

- 25 - dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 0,9 M y dihidrogenofosfato potásico aproximadamente 0,9 M a pH aproximadamente 4,1 y
- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 1,8 M sin la sal de potasio, a pH aproximadamente 4,1.

30 **Discusión de los resultados de los experimentos de cristalización por difusión de vapor:**

Los experimentos de cristalización se realizaron inicialmente usando una metodología a microescala bien descrita. Como se describió una condición de PEG 4.000/tampón acetato sódico como una condición de cristalización prometedora por otros inventores que estaban trabajando con diferentes anticuerpos de diferente especificidad de antígeno u origen, se decidió empezar con estos agentes. Se descubrió después de experimentación extensiva que el PEG 4.000 en un tampón acetato no proporcionaba cristales, al menos en las combinaciones investigadas de factores que influyen en la cristalización (concentración de proteína, concentración del agente de precipitación, fuerza iónica del tampón y pH, temperatura), y por tanto se decidió continuar con tamices amplios de cristalización, introduciendo de este modo una amplia diversidad de agentes químicos en el proceso de cribado. Finalmente, se descubrió sorprendentemente que el dihidrogenofosfato sódico en tampón acetato es un potente agente de cristalización para D2E7, que no introduce ningún reactivo tóxico inaceptable desde un punto de vista farmacéutico.

D. Experimentos de cristalización discontinua

45 Los valores de concentración dados en los siguientes ejemplos son valores iniciales que se refieren a la solución de anticuerpo y la solución de cristalización antes de mezclar las dos soluciones.

Todos los valores de pH, si no se describen de otro modo, se refieren al pH de una solución madre de tampón acetato antes de combinarla con otras sustancias, como el agente de cristalización.

50 Todas las molaridades del tampón, si no se describen de otro modo, se refieren a las concentraciones de acetato sódico en una solución madre antes del ajuste del pH, típicamente realizado usando ácido acético glacial.

55 **Ejemplo 33 - Cristalización discontinua en dihidrogenofosfato de sodio y potasio/acetato sódico a un volumen de lote de 800 µl**

El D2E7 se tamponó en un tampón HEPES 20 mM/cloruro sódico 150 mM a pH 7,4. La concentración de proteína se ajustó a 5 mg/ml, 10 mg/ml, o 20 mg/ml.

60 La cristalización discontinua se realizó mezclando aproximadamente 400 µl de cada solución de proteína con una cantidad igual de solución de cristalización en un tubo de reacción Eppendorff de 1,5 ml. Se prepararon 400 µl de una solución de cristalización particular mezclando tampón acetato, solución madre de dihidrogenofosfato sódico, solución madre de dihidrogenofosfato potásico y agua Milli Q. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato fue de 0,1 M, y el pH del tampón acetato fue de aproximadamente 4,1. Se usó la siguiente combinación de dihidrogenofosfato sódico y dihidrogenofosfato potásico: dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 0,9 M y

65

dihidrogenofosfato potásico aproximadamente 0,9 M. Los tubos de reacción se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las alícuotas de 1 μ l se realizó después de 11 días.

RESULTADOS: No se observaron cristales después de 11 días.

5 **Ejemplo 34 - Cristalización discontinua en dihidrogenofosfato sódico/acetato sódico a un volumen de lote de 600 μ l**

10 El D2E7 se tamponó en un tampón HEPES 20 mM/cloruro sódico 150 mM a pH 7,4. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

15 La cristalización discontinua se realizó mezclando aproximadamente 300 μ l de la solución de proteína con una cantidad igual de solución de cristalización en un tubo de reacción Eppendorff de 1,5 ml. Se prepararon 300 μ l de una solución de cristalización particular mezclando tampón acetato, solución madre de dihidrogenofosfato sódico y agua Milli Q. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato fue de 0,1 M, y el pH del tampón acetato fue de aproximadamente 4,1. La molaridad del dihidrogenofosfato sódico fue de aproximadamente 1,5 M, 1,8 M, 2,1 M y 2,4 M, respectivamente. Los tubos de reacción se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las alícuotas de 1 μ l se realizó después de 11 días.

20 **RESULTADOS:** No se observaron cristales después de 11 días.

Ejemplo 35 - Cristalización discontinua en tamiz de rejilla de dihidrogenofosfato de sodio y potasio/acetato sódico a un volumen de lote de 1 ml

25 El D2E7 se usó sin intercambiar el tampón. Por tanto, la composición inicial fue D2E7 50 mg/ml, manitol 12 mg/ml, polisorbato 80 1 mg/ml, ácido cítrico monohidrato 1,305 mg/ml, citrato sódico 0,305 mg/ml, hidrogenofosfato disódico dihidrato 1,53 mg/ml, dihidrogenofosfato sódico deshidratado 0,86 mg/ml, y cloruro sódico 6,16 mg/ml, pH 5,2.

30 El D2E7 se llevó a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml por dilución con agua Milli Q.

35 La cristalización discontinua se realizó mezclando aproximadamente 500 μ l de la solución de proteína con una cantidad igual de solución de cristalización en un pocillo de una placa de 24 pocillos. Se prepararon 500 μ l de una solución de cristalización particular mezclando tampón acetato, solución madre de dihidrogenofosfato sódico, solución madre de dihidrogenofosfato potásico y agua Milli Q en un pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato fue de 0,1 M, y el pH del tampón acetato fue de aproximadamente 4,1, 4,6, 5,1 o 5,6. Se usaron las siguientes combinaciones de dihidrogenofosfato sódico y dihidrogenofosfato potásico:

- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 0,7 M y dihidrogenofosfato potásico aproximadamente 0,7 M,
- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 0,9 M y dihidrogenofosfato potásico aproximadamente 0,9 M,
- 40 - dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 1,8 M sin la sal de potasio,
- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 2,1 M sin la sal de potasio,
- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 2,4 M sin la sal de potasio.

45 Los pocillos posteriormente se sellaron después de la preparación de la mezcla de cristalización para evitar la evaporación del agua. La microscopía de la placa se realizó después de 4 días.

RESULTADOS: No se observaron cristales después de 4 días.

50 **Ejemplo 36 - Cristalización discontinua en tamiz de rejilla de dihidrogenofosfato de sodio y potasio/acetato sódico a un volumen de lote de 1 ml**

El D2E7 se tamponó en un tampón HEPES 20 mM/cloruro sódico 150 mM a pH 7,4. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

55 La cristalización discontinua se realizó mezclando aproximadamente 500 μ l de la solución de proteína con una cantidad igual de solución de cristalización en un pocillo de una placa de 24 pocillos. Se prepararon 500 μ l de una solución de cristalización particular mezclando tampón acetato, solución madre de dihidrogenofosfato sódico, solución madre de dihidrogenofosfato potásico y agua Milli Q en un pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato fue de 0,1 M, y el pH del tampón acetato fue de aproximadamente 4,1 o 4,6. Se aplicaron las siguientes combinaciones de dihidrogenofosfato sódico y dihidrogenofosfato potásico:

- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 1,8 M y dihidrogenofosfato potásico aproximadamente 0,8 M,
- dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 2,2 M y dihidrogenofosfato potásico aproximadamente 0,6 M,
- 65 - dihidrogenofosfato sódico de aproximadamente 2,6 M a dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 4,4 M en etapas de 0,2 M sin la sal de potasio, respectivamente.

Los pocillos posteriormente se sellaron después de la preparación de la mezcla de cristalización para evitar la evaporación del agua. La microscopía de la placa se realizó múltiples veces durante la siguiente semana. Además, se determinó el rendimiento de los cristales de tres lotes por DO280. Se centrifugó una alícuota de la suspensión a 14.000 rpm, y se evaluó la concentración de proteína en el sobrenadante.

5

RESULTADOS: Se hallaron cristales de tipo grupo de agujas en los siguientes ocho lotes:

- tampón acetato pH 4,1 y molaridad de dihidrogenofosfato sódico de aproximadamente 3,6 M a aproximadamente 4,4 M (en etapas de 0,2 M),
- 10 - tampón acetato pH 4,6 y molaridad de dihidrogenofosfato sódico de aproximadamente 4,0 M a aproximadamente 4,4 M (en etapas de 0,2 M).

El rendimiento de los cristales se evaluó para lotes en tampón acetato pH 4,1 y molaridad de dihidrogenofosfato sódico de aproximadamente 4,0 M a aproximadamente 4,4 M. El rendimiento de los cristales determinado por DO280 de la concentración de proteína residual en el sobrenadante estuvo por encima del 95% después de cinco días.

15

Obviamente hubo especies precipitadas presentes en estos lotes inmediatamente después de combinar la solución de proteína y la solución de cristalización (suspensión lechosa, imagen de microscopía óptica típica). Como no se observaron especies precipitadas después de cinco días, se concluyó que las especies precipitadas anteriores se reordenaron en especies cristalinas. La proteína está altamente supersaturada en la mezcla de cristalización, y la proteína precipita inmediatamente. Aún puede disolverse algo de proteína, ahora solamente ligeramente supersaturada o quizás incluso por debajo de la saturación. De este modo se forma cristales disminuyendo adicionalmente la concentración de la proteína disuelta. Además, las especies precipitadas se redissuelven claramente con el tiempo y se incorporan en los cristales en crecimiento.

20

Ejemplo 37 - Cristalización discontinua en tamiz de rejilla de dihidrogenofosfato sódico/acetato sódico a un volumen de lote de 1 ml, diferente concentración de proteína

30 El D2E7 se usó sin intercambiar el tampón (véase el Ejemplo 35).

El D2E7 se llevó a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml diluyendo el líquido con agua Milli Q.

La cristalización discontinua se realizó mezclando aproximadamente 500 μ l de la solución de proteína con una cantidad igual de solución de cristalización en un pocillo de una placa de 24 pocillos. Se prepararon 500 μ l de una solución de cristalización particular mezclando tampón acetato, solución madre de dihidrogenofosfato sódico, solución madre de dihidrogenofosfato potásico y agua Milli Q en un pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato fue de 0,1 M, y el pH del tampón acetato fue de aproximadamente 4,1 o 4,6. La molaridad del dihidrogenofosfato sódico se varió de dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 2,6 M a dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 4,4 M en etapas de 0,2 M. Los pocillos posteriormente se sellaron después de la preparación de la mezcla de cristalización para evitar la evaporación del agua. La microscopía de la placa se realizó múltiples veces durante la siguiente semana. Además, se determinó el rendimiento de los cristales de un lote particular por DO280. Se centrifugó una alícuota de la suspensión a 14.000 rpm, y se evaluó la concentración de proteína en el sobrenadante.

45

RESULTADOS: Se hallaron cristales de tipo grupo de agujas en los siguientes seis lotes:

- tampón acetato pH 4,1 y molaridad de dihidrogenofosfato sódico de aproximadamente 3,4 M a aproximadamente 4,4 M (en etapas de 0,2 M).

50

El rendimiento de los cristales se evaluó para el lote en tampón acetato pH 4,1 y molaridad de dihidrogenofosfato sódico de aproximadamente 4,2 M. El rendimiento de los cristales determinado por DO280 de la concentración de proteína residual en el sobrenadante estuvo por encima del 95% después de ocho días.

55 Obviamente hubo especies precipitadas presentes en estos lotes inmediatamente después de combinar la solución de proteína y la solución de cristalización (suspensión lechosa, imagen de microscopía óptica típica). Como no se observaron especies precipitadas después de seis días, se concluyó que sucedía una transición de fase en que las especies precipitadas anteriores se reordenaban en especies cristalinas.

Ejemplo 38 - Cristalización discontinua en dihidrogenofosfato sódico/acetato sódico a un volumen de lote de 2 ml

El D2E7 se tamponó en un tampón HEPES 20 mM/cloruro sódico 150 mM a pH 7,4. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml.

65

La cristalización discontinua se realizó mezclando aproximadamente 1 ml de la solución de proteína con una cantidad igual de solución de cristalización en un tubo de reacción Eppendorff de 2 ml. Se preparó 1 ml de una solución de cristalización particular mezclando tampón acetato, solución madre de dihidrogenofosfato sódico y agua Milli Q. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato fue de 0,1 M, y el pH del tampón acetato fue de aproximadamente 4,1. La molaridad del dihidrogenofosfato sódico fue de aproximadamente 4,0 M, 4,2 M o 4,4 M. Los tubos de reacción se almacenaron a temperatura ambiente. La microscopía de las alícuotas de 1 μ l se realizó múltiples veces durante la siguiente semana.

RESULTADOS: Se hallaron cristales de tipo grupo de agujas en todos los lotes después de seis días.

Obviamente hubo especies precipitadas presentes en estos lotes inmediatamente después de combinar la solución de proteína y la solución de cristalización (suspensión lechosa, imagen de microscopía óptica típica). Las especies precipitadas anteriores se reordenaron en especies cristalinas como se ha descrito en el Ejemplo 36.

Ejemplo 39 - Cristalización discontinua en tamiz de rejilla de dihidrogenofosfato sódico/acetato sódico a un volumen de lote de 1 ml, diferente concentración de proteína

El D2E7 se usó sin intercambiar el tampón (véase el Ejemplo 35).

La cristalización discontinua se realizó mezclando aproximadamente 500 μ l de la solución de proteína con una cantidad igual de solución de cristalización en un pocillo de una placa de 24 pocillos. Se prepararon 500 μ l de una solución de cristalización particular mezclando tampón acetato, solución madre de dihidrogenofosfato sódico, solución madre de dihidrogenofosfato potásico y agua Milli Q en un pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato fue de 0,1 M, y el pH del tampón acetato fue de aproximadamente 4,1. La molaridad del dihidrogenofosfato sódico se varió de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 4,4 M en etapas de 0,2 M. Los pocillos posteriormente se sellaron después de la preparación de la mezcla de cristalización para evitar la evaporación del agua. La microscopía de la placa se realizó múltiples veces durante la siguiente semana. Además, se determinó el rendimiento de los cristales por del lote por DO280. Se centrifugó una alícuota de la suspensión a 14.000 rpm, y se evaluó la concentración de proteína en el sobrenadante.

RESULTADOS: Se hallaron cristales de tipo grupo de agujas en los siguientes dos lotes:

- molaridad de dihidrogenofosfato sódico de aproximadamente 3,4 M y aproximadamente 3,6 M.

También estuvieron presentes especies precipitadas y fases oleosas de precipitación en estos lotes que contienen cristales

Ejemplo 40 - Cristalización discontinua en dihidrogenofosfato sódico/acetato sódico a un volumen de lote de 20 ml, con agitación

El D2E7 se usó sin intercambiar el tampón (véase el Ejemplo 35).

El D2E7 se llevó a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml por dilución con agua Milli Q.

La cristalización discontinua se realizó mezclando aproximadamente 10 ml de solución de proteína con una cantidad igual de solución de cristalización en un tubo Falcon de 50 ml. Se prepararon 10 ml de la solución de cristalización mezclando tampón acetato, solución madre de dihidrogenofosfato sódico y agua Milli Q en el tubo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato fue de 0,1 M, y el pH del tampón acetato fue de aproximadamente 4,1. La molaridad del dihidrogenofosfato sódico fue de 4,2 M. El tubo se almacenó a temperatura ambiente, agitando el lote en un agitador de laboratorio. La microscopía de una alícuota de 1 μ l de la solución se realizó múltiples veces durante el siguiente mes.

RESULTADOS: Se observó materia precipitada en este lote.

Ejemplo 41a - Cristalización discontinua en dihidrogenofosfato sódico/acetato sódico a un volumen de lote de 100 ml, sin agitación

El D2E7 se usó sin intercambiar el tampón (véase el Ejemplo 35).

El D2E7 se llevó a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml por dilución con agua Milli Q.

La cristalización discontinua se realizó mezclando aproximadamente 50 ml de solución de proteína con una cantidad igual de solución de cristalización en un frasco de polipropileno de 1 l limpio. Se prepararon 50 ml de la solución de cristalización mezclando tampón acetato, solución madre de dihidrogenofosfato sódico y agua Milli Q en el tubo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato fue de 0,1 M, y el pH del tampón acetato fue de aproximadamente

4,1. La molaridad del dihidrogenofosfato sódico fue de 4,2 M. El recipiente se almacenó a temperatura ambiente. La microscopía de una alícuota de 1 µl de la solución se realizó múltiples veces durante el siguiente mes.

RESULTADOS: Se observaron cristales de tipo grupo de agujas después de siete días. El rendimiento de los cristales determinado por DO280 de la concentración de proteína residual en el sobrenadante estuvo por encima del 95% después de siete días.

Hubo especies precipitadas presentes en este lote inmediatamente después de combinar la solución de proteína y la solución de cristalización (suspensión lechosa, imagen de microscopía óptica típica). Como no se observaron especies precipitadas después de siete días, se concluyó que sucedía una transición de fase donde las especies precipitadas anteriores se reordenaban en especies cristalinas.

Ejemplo 41b - Cristalización discontinua en dihidrogenofosfato sódico/acetato sódico a un volumen de lote de 1 ml, 50 ml y 10 l, sin agitación

También se realizó cristalización a gran escala de D2E7 combinando 1 l de D2E7 a 50 mg/ml en formulación de tampón comercial de Adalimumab pH 5,2 (véase el Ejemplo 35) y 4 l de agua para inyección (WFI) en un recipiente de polipropileno de 10 l (Nalgene®). La solución se homogeneizó por agitación suave. Esta solución de 5 l de D2E7 (10 mg/ml) después se mezcló con 5 l de solución de agente de precipitación (dihidrogenofosfato sódico 5 M, 4.400 ml, tampón acetato sódico 1 M, pH 4,1, 500 ml, WFI (Ampuwa), 100 ml). La solución de agente de precipitación se añadió en porciones de 500 ml. Después de la adición de cada porción, la solución se homogeneizó por rotación/inversión suave del frasco. Después de la adición de aproximadamente 2.500 a -3.000 ml de la solución de agente de precipitación, apareció un precipitado blanco. El agente de precipitación restante se añadió todo de una vez. Después se homogeneizó la preparación de cristales (rotación/inversión suave) de nuevo.

Inmediatamente después de la fabricación del lote (es decir después de mezclar 5 l de la solución de D2E7 y 5 l del agente de precipitación), se extrajeron alícuotas de 1 ml (cargadas en viales de muestra Eppendorff de bajo volumen) y 50 ml (cargadas en tubos de muestra Falcon de 50 ml) y se almacenaron adyacentes al recipiente de 10 l para su control y para la evaluación del impacto del tamaño del lote sobre la cristalización de D2E7. Como se resume en las Fig. 2 a 4, el volumen del lote (es decir 1 ml, 50 ml y 10 l, respectivamente) no tuvo impacto sobre el tamaño de las agujas/grupos de agujas de los cristales de D2E7.

Discusión de los resultados de los experimentos de cristalización discontinua:

Como la técnica a microescala aplicada (véase la Sección D. supra) no es factible para producción a gran escala de cristales de proteína, se transfirieron las condiciones de cristalización descubiertas por estos métodos a microescala a un modo discontinua de escala modificable.

El D2E7 se cristalizó satisfactoriamente a un volumen de lote de 100 ml con un rendimiento finalmente elevado (> 95%) y reproducibilidad, lo que indica que este sistema de cristalización es aplicable para procesamiento industrial. Por análisis SDS-PAGE, se demostró el carácter proteico de los cristales. El análisis SE-HPLC de los cristales redissueltos mostró solamente un ligero aumento en las especies agregadas. Fue posible el lavado de los cristales usando un tampón acetato que contenía dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 4,2 M, dihidrogenofosfato sódico, en acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 4,1. No existió solubilidad medible de los cristales de D2E7 en dicho tampón de lavado, analizada por DO280, recuperando más del 90% de los cristales.

Las condiciones experimentales de los experimentos discontinuos anteriores se resumen en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1 - Experimentos discontinuos

Ej.	Volumen de lote	Solución de cristalización	Intercambio de tampón	Rendimiento de los cristales	pH del tampón	pH final	Conc. de proteína final mg/ml	Temp.	Día de control visual
33	800 µl	NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 0,9 M, KH ₂ PO ₄ 0,9 M	sí	ninguno	4,1		2,5-10	amb	11 d
34	600 µl	NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 1,5 - 2,4 M	sí	ninguno	4,1		5	amb	11 d

Ej.	Volumen de lote	Solución de cristalización	Intercambio de tampón	Rendimiento de los cristales	pH del tampón	pH final	Conc. de proteína final mg/ml	Temp.	Día de control visual
35	1 ml	NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 0,7 M, KH ₂ PO ₄ 0,7 M		ninguno	4,1-5,6		5	amb	4 d
		NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 0,9 M, KH ₂ PO ₄ 0,9 M			4,1-5,6				
		NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 1,8 M,			4,1-5,6				
		NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 2,1 M,			4,1-5,6				
		NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 2,4 M,			4,1-5,6				
36	1 ml	NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 3,6 - 4,4 M	sí	>95%	4,1	3,9-3,7	5	amb	5 d
		NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 4,0 - 4,4 M			4,6	4,0-3,9		amb	
37	1 ml	NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 3,4 - 4,4 M		>95%	4,1	3,9-3,7	5	amb	6 d
38	2 ml	NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 4,0 - 4,4 M	sí	n.d.	4,1	3,9-3,7	5	amb	6 d
39	1 ml	NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 3,4 - 3,6 M		n.d + precipitado	4,1		25	amb	6 d
40	20 ml con agitación	NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 4,2M		precipitado	4,1	3,8	5	amb	4 d
41a	100 ml sin agitación	NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 4,2 M		>95%	4,1	3,8	5	amb	7 d
41b	1 ml, 50 ml o 10 l	NaAc 0,1 M, NaH ₂ PO ₄ 4,4 M		n.d.	4,1	n.d.	5	amb	

E. Métodos para procesar cristales y análisis

5 Ejemplo 42 - Lavado de los cristales

Después de la formación de los cristales, es favorable una etapa de lavado sin redissolver los cristales. Por lo tanto, después de finalizar el proceso de cristalización, se transfirió la suspensión de cristales en un tubo de centrifugación y se centrifugó de 500 a 1000 x g durante veinte minutos. La centrifugación se realizó a 4°C, pero también puede realizarse a otras temperaturas factibles, por ejemplo, a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el sedimento de cristales en un tampón que contenía dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 4,2 M en acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 4,1. No apareció solubilidad medible de los cristales de D2E7 en el tampón de lavado, analizado por DO280. Las etapas de centrifugación/resuspensión se repitieron posteriormente de una a tres veces, y después de este procedimiento de lavado, se resuspendió el sedimento y se almacenó en un tampón que contenía dihidrogenofosfato sódico aproximadamente 4,2 M en acetato sódico aproximadamente 0,1 M a un pH de aproximadamente 4,1.

20 Ejemplo 43 - Análisis de cristales por SDS-PAGE

Para demostrar el carácter proteico de los cristales, los cristales se lavaron con un tampón de lavado descrito en el ejemplo 42. Después de asegurar por DO280 que no había más proteína disuelta presente en el sobrenadante después de la centrifugación, se descartó el sobrenadante, y los cristales se disolvieron posteriormente en agua destilada. La medición de DO280 de esta solución reveló que los cristales constaban esencialmente de proteína, ya que la absorbancia de la muestra ahora era significativamente superior que en el tampón de lavado residual. El análisis por SDS-PAGE de esta solución de cristales redissueltos, en comparación con una muestra de D2E7 original, mostró el mismo patrón.

F. Ejemplos diversos

30 Los valores de concentración dados en los siguientes ejemplos son valores iniciales que se refieren a la solución de anticuerpo y la solución de cristalización antes de mezclar las dos soluciones.

Todos los valores de pH, si no se describen de otro modo, se refieren al pH de una solución madre de tampón acetato antes de combinarse con otras sustancias, como el agente de cristalización.

5 Todas las molaridades del tampón, si no se describen de otro modo, se refieren a las concentraciones de acetato sódico en una solución madre antes del ajuste del pH, típicamente realizado usando ácido acético glacial.

Ejemplo 44 - Agente de cristalización sólido

10 El D2E7 se usó sin intercambiar el tampón (véase el Ejemplo 35).

El D2E7 se llevó a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml diluyendo el líquido con agua Milli Q.

15 La cristalización discontinua se realizó mezclando aproximadamente 500 μ l de la solución de proteína con una cantidad igual de tampón acetato (0,1 M, pH 4,1 o 4,6, respectivamente) en un pocillo de una placa de 24 pocillos. Posteriormente, se añadió dihidrogenofosfato sódico dihidrato sólido a seis proporciones diferentes para cada ajuste de pH: aproximadamente 0,23 g, 0,27 g, 0,30 g, 0,33 g, 0,36 g y 0,39 g. Por tanto, después de la disolución completa del agente de cristalización, la concentración era aproximadamente 1,5 M a 2,5 M en etapas de 0,2 M. Los pocillos se sellaron posteriormente y la placa se agitó en un agitador de laboratorio hasta la disolución completa del agente de cristalización. Después de ello, la placa de 24 pocillos se almacenó a temperatura ambiente sin agitación. La
20 microscopía de la placa se realizó después de cinco días.

RESULTADOS: Se hallaron cristales de tipo grupo de agujas en los siguientes siete lotes:

- 25 - tampón acetato pH 4,1 y molaridad de dihidrogenofosfato sódico de aproximadamente 2,1 M, 2,3 M y 2,5 M, respectivamente.
- tampón acetato pH 4,6 y molaridad de dihidrogenofosfato sódico de aproximadamente 1,9 M, 2,1 M, 2,3 M y 2,5 M, respectivamente.

Ejemplo 45 - Diferente protocolo de preparación de tampón y preparación de cristales

30 En este ejemplo, los tampones acetato se prepararon como se describe a continuación: se diluyeron 3 g de ácido acético glacial con aproximadamente 42 ml de agua purificada. El pH se ajustó con solución de hidróxido sódico y se ajustó el volumen a 50 ml. En este caso, la cantidad total de acetato se fija a 1 M (100 mM en la solución de cristalización, o 50 mM en la mezcla de cristalización) y no se expandió por ajuste del pH.

35 El D2E7 se usó sin intercambiar el tampón (véase el Ejemplo 35).

El D2E7 se llevó a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml diluyendo el líquido con agua Milli Q.

40 La cristalización discontinua se realizó mezclando aproximadamente 500 μ l de la solución de proteína con una cantidad igual de solución de cristalización en un pocillo de una placa de 24 pocillos. Se prepararon 500 μ l de una solución de cristalización particular mezclando tampón acetato, solución madre de dihidrogenofosfato sódico, solución madre de dihidrogenofosfato potásico y agua Milli Q en un pocillo. En este ejemplo, la molaridad del tampón acetato fue de 0,1 M, y el pH del tampón acetato fue de aproximadamente 4,1 y 4,6, respectivamente. La molaridad
45 del dihidrogenofosfato sódico se varió de aproximadamente 3,4 M a aproximadamente 4,4 M en etapas de 0,2 M. Los pocillos posteriormente se sellaron después de la preparación de la mezcla de cristalización para evitar la evaporación del agua. La microscopía de la placa se realizó después de cinco días.

RESULTADOS: Se hallaron cristales de tipo grupo de agujas en los siguientes nueve lotes:

- 50 - tampón acetato pH 4,1 y molaridad de dihidrogenofosfato sódico de aproximadamente 3,6 a 4,4, en etapas de 0,2.
- tampón acetato pH 4,6 y molaridad de dihidrogenofosfato sódico de aproximadamente 3,6 a 4,2, en etapas de 0,2.

Ejemplo 46 - Preparación de cristales encapsulados

60 Los cristales obtenidos en el ejemplo 41 están cargados positivamente, determinado mediante medición del potencial zeta usando un Malvern Instruments Zetasizer nano.

Los cristales se lavan y suspenden en un tampón que contiene excipientes que conservan la cristalinidad, y que tiene un pH que mantiene los cristales cargados. Posteriormente, se añade un agente de encapsulación apropiado a la suspensión de cristales. En este contexto, un agente de encapsulación apropiado es una sustancia (polimérica) con baja toxicidad, biodegradabilidad y carácter contraiónico. Debido a este carácter contraiónico, la sustancia se
65 atrae hacia los cristales y permite el recubrimiento. Mediante esta técnica, la disolución de los cristales en medios

que no contienen ningún otro excipiente que mantenga la cristalinidad está preferiblemente sostenida.

Ejemplo 47 - Preparación de cristales encapsulados/integrados

5 Los cristales se obtienen como se describe en el ejemplo 41.

Los cristales se lavan y suspenden en un tampón que contiene excipientes que conservan la cristalinidad. Los cristales después pueden

- 10 - integrarse por secado de los cristales y combinación de estos cristales secados con un vehículo, por ejemplo por compresión, dispersión en estado fundido, etc.
- encapsularse/integrarse por combinación de una suspensión de cristales con una solución de vehículo que no es miscible con agua. El vehículo precipita después de retirar el disolvente del vehículo. Posteriormente, el material se seca.
- 15 - encapsularse/integrarse por combinación de una suspensión de cristales con una solución de vehículo miscible en agua. El vehículo precipita según se excede su límite solubilidad en la mezcla.
- integrarse por combinación de los cristales secados o una suspensión de cristales con una solución de vehículo miscible en agua.
- integrarse por combinación de los cristales secados con una solución de vehículo que no es miscible en agua.
- 20

G. Caracterización de los cristales

En la siguiente sección se resumen experimentos que se realizaron para determinar si el anticuerpo monoclonal D2E7 cristalino retiene la bioactividad característica de D2E7 nunca cristalizado tras la redisolución del material cristalino.

25

G1. Ensayo de bioactividad con células murinas L-929

a) Método general

30

Se determinó el efecto neutralizante de la solución de D2E7 frente al efecto citotóxico de TNF humano recombinante (rHuTNF). Esto implicó incubar células de ratón L-929 como indicador en una placa de microtitulación de 96 pocillos en presencia de diversas concentraciones de D2E7 durante 48 horas con una cantidad definida de rHuTNF a 37°C. Las células supervivientes se tiñeron con cristal violeta. La intensidad del color se midió por espectrofotometría en los pocillos individuales de la placa de microtitulación y se evaluó. Se midió la CI_{50} , es decir, la concentración de D2E7 que reducía el efecto citotóxico de rHuTNF sobre células L-929 de modo que el 50% de las células sobrevivían.

35

En un espacio de dilución diferente, partiendo de las diluciones de 1 µg de proteína/ml, se prepararon individualmente los 9 puntos para medir la curva de titulación (diluciones de curva) en los tubos de dilución para la muestra y el patrón de referencia.

40

La suspensión de células L-929 a usar se diluyó con medio para proporcionar una concentración de 60.000 células/ml. Posteriormente se pipetearon 100 µl por pocillo de la concentración celular respectiva en las columnas 1 - 11 de la placa de ensayo. Los pocillos en la columna 12 contenían solamente 100 µl de medio cada uno. La incubación se aplicó a 37°C y CO₂ al 5% (v/v) durante 24 horas en la placa de ensayo.

45

Después de 24 horas de incubación, se transfirieron 50 µl de cada una de las 9 diluciones de curva de titulación desde el espacio de dilución hasta la placa de ensayo para el patrón de referencia o la muestra, es decir para el patrón de referencia a los pocillos en las filas A - D en las columnas 1 - 9 y para la muestra a los pocillos en las filas E - H en las columnas 1 a 9.

50

Se pipetearon 50 µl de medio en la columna 10; y se pipetearon 100 µl en cada una de las columnas 11 y 12.

55 Se pipetearon 50 µl de patrón de referencia de TNF (12,5 ng de proteína/ml de medio) en los pocillos en la columna 1 a 10, fila A a H, mediante los cual la columna 10 correspondía al valor de lisis del 100% (control de TNF).

La columna 11 era el control de crecimiento al 100%, y la columna 12 no contenía material celular y por tanto actuaba como blanco. El volumen final por pocillo fue de 200 µl.

60

La incubación de las placas de ensayo se realizó durante 48 horas a 37°C y con CO₂ al 5%. Después de incubación durante 2 días, los líquidos de la placa de ensayo se descartaron volteándola rápidamente y dando una única sacudida vigorosa hacia abajo. Después se pipetearon 50 µl de solución de cristal violeta (cristal violeta al 0,75%, cloruro sódico al 0,35%, etanol al 32,4% y formaldehído al 8,6%) en cada pocillo. La solución se dejó en los pocillos durante 15 minutos y después se descartó como se ha descrito anteriormente. Después las placas se lavaron y se

65

secaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, se pipetearon 100 μl de solución de reactivo (etanol al 50% y ácido acético al 0,1%) en cada pocillo. La agitación de las placas (a aproximadamente 300 rpm durante 15 min.) produjo una solución coloreada uniformemente en cada uno de los pocillos.

5 Se midió la absorbancia del colorante en los pocillos de la placa de ensayo en un fotómetro de placa a 620 nm. Los valores individuales se representaron en un gráfico, con la absorbancia (eje y) representada frente a la dilución respectiva o concentración en ng/ml (eje x) del anticuerpo. Del diagrama de 4 parámetros, se midió la concentración a la que sobrevive la mitad de las células y muere la mitad (valor de CI_{50}). Esta concentración se calculó mediante el parámetro 3 de la función de 4 parámetros de los datos de la curva. Se calcularon los valores medios de las concentraciones del patrón de referencia. La actividad biológica relativa de la muestra se calculó dividiendo el valor medio de CI_{50} del patrón de referencia por los valores individuales de CI_{50} de la muestra y la multiplicación por 100%. Después se promediaron las actividades relativas.

15 b) Actividad relativa para cristales de D2E7

El ensayo se realizó como una comparación de la actividad biológica de la muestra con la de un patrón de referencia. Los valores de absorción, representados frente a la concentración de D2E7 y evaluados por una regresión no lineal de 4 parámetros, revelaron los valores de CI_{50} para la inhibición del efecto de TNF por el anticuerpo. Como ambas muestras se procesaron en cuatro repeticiones sobre una microplaca, esto produce cuatro valores de CI_{50} para el patrón de referencia de D2E7 y la muestra respectivamente. Posteriormente, se calculó la media de los valores de CI_{50} del patrón de referencia y se evaluó la actividad relativa de cada repetición de la muestra dividiendo el valor medio de CI_{50} del patrón de referencia por el valor de CI_{50} relevante de la muestra y multiplicación por 100%.

25 El ensayo de la muestra (suspensión de cristales de 2,7 mg/ml, preparada como se describe en el Ejemplo 36) reveló una actividad biológica relativa del 111%.

30 Por tanto, la muestra puede considerarse completamente activa biológicamente.

G2. Caracterización microscópica

A continuación se presentarán los datos sobre la caracterización microscópica de cristales de D2E7.

35 a) Análisis óptico de muestras discontinuas de cristales de mAb

Después de la homogeneización, se pipetearon alícuotas de 1 a 10 μl de volumen de muestra en una placa portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio. Las preparaciones de cristales se evaluaron usando un microscopio óptico invertido Zeiss Axiovert 25 equipado con oculares E-PI 10x y objetivos 10x, 20x y 40x, respectivamente. Se tomaron fotografías usando una cámara digital (Sony Cybershot DSC S75).

b) Análisis óptico de experimentos de difusión de vapor, evaluación de los tamaños aproximados del cristal y detección de birrefringencia

45 Para este propósito, se usó un microscopio Nikon Labophot, equipado con oculares CFW 10x y objetivos 4x, 10x, 20x y 40x, respectivamente.

50 Para la evaluación de experimentos de difusión de vapor, se exploraron gotas de muestra en las placas de 24 pocillos.

Los tamaños de cristal se evaluaron transfiriendo la imagen microscópica a una pantalla de ordenador mediante una videocámara a color JVC TK C1380, y midiendo la longitud o diámetro de los cristales representativos de tipo aguja o tipo grupo de agujas, aplicando el software JVC Digital Screen Measurement Comet versión 3.52a. Además, el microscopio estaba equipado con un conjunto de filtros (polarizador y analizador) para evaluar el comportamiento birrefringente de las muestras.

Si las direcciones de polarización de los filtros polarizador y analizador se establecen a un ángulo de 90° relativo uno al otro ("polarizadores cruzados"), no pasará luz a través hasta el visor del microscopio; la imagen aparecerá oscura o negra. Si ahora una muestra, que se coloca en el haz de luz entre los polarizadores cruzados, es capaz de rotar el plano de polarización de la luz, se observará un resplandecimiento distinto de la muestra frente a un fondo oscuro. Este comportamiento, llamado "birrefringencia", distingue la materia cristalina ordenada (anisotrópica) de la materia amorfa no ordenada (isotrópica). Como la birrefringencia es característica de la materia anisotrópica, este aspecto resplandeciente demuestra la existencia de materia cristalina. Sin embargo, la ausencia de birrefringencia no excluye la existencia de materia cristalina, ya que los cristales también pueden mostrar simetría cúbica y por lo tanto se isotrópicos, como la materia amorfa.

c) Resultados

En las Figuras 1 a 4 adjuntas se presentan imágenes representativas de cristales de D2E7.

5 La Figura 1 muestra cristales de D2E7 obtenidos por cristalización discontinua a pequeña escala de acuerdo con el Ejemplo 37 después de 6 días a temperatura ambiente (concentración final de proteína de 5 mg/ml; tampón de cristalización: dihidrogenofosfato sódico 4,2 M en acetato sódico 0,1 M, pH 4,1). Los cristales mostraban birrefringencia.

10 Las Figuras 2 a 4 muestran cristales de D2E7 obtenidos por cristalización discontinua a gran escala de acuerdo con el Ejemplo 41b.

Capacidad inyectable: Una suspensión de cristales de D2E7 de 200 mg/ml de proteína incorporada en cristales y formulada en un tampón que contenía PEG 4.000 al 20% (m/v) se puede inyectar a través de una jeringa 27 ½ G.

15

G3. Birrefringencia

Para demostrar que la cristalización de Adalimumab de hecho proporciona material cristalino, se analizó su birrefringencia.

20

Proteína: Se diluyó Adalimumab a 70 mg/ml en tampón de formulación con agua doblemente destilada hasta 10 mg/ml.

Precipitante: NaH₂PO₄ 4 M (polvo disuelto en agua doblemente destilada)

25

Método: Microcristalización discontinua en una placa de gota colgante con pocillo compartimentado de 2 ml, se mezclan 500 µl de solución de proteína con 500 µl de proteína; sin NaOAc en la solución.

Temperatura: 24°C.

30

Equipo técnico para la medición de la birrefringencia: Microscopio de disección Nikon SMZ1500 stereo equipado con una cámara Nikon CoolPix CCD. La birrefringencia de los cristales se fotografió bajo polarizadores cruzados. El aumento es de aproximadamente 200x.

35 Se muestran micrografías correspondientes en la Figura 5A. Se observa una marcada birrefringencia de los grupos de cristales de tipo aguja de Adalimumab. El color de los cristales cambia de azul a rojo, después de nuevo a azul, ya que la orientación del eje de la aguja del cristal rota respecto a la dirección de polarización de la luz.

Se representa una serie adicional de micrografías en las Figuras 5B, C y D.

40

Todas las imágenes se tomaron con un microscopio Nikon Eclipse E600 POL y una cámara digital Nikon DXM 1200. El aumento es de aproximadamente 40x.

45 La imagen de la Figura 5B (gris) está tomada con polarizadores planos y muestra la morfología de la partícula. Los cristales blancos sobre el fondo negro (Figura 5D) muestran birrefringencia y se capturaron con polarizadores cruzados. Los cristales azules y naranjas sobre el fondo púrpura (Figura 5C) muestran birrefringencia y se capturaron con polarizadores cruzados y un compensador rojo o placa de cuarto de onda.

H. Capacidad inyectable de los cristales

50

En la siguiente sección, se realizaron experimentos para determinar la capacidad inyectable de las suspensiones cristalinas (en PEG) del anticuerpo monoclonal D2E7 (10-200 mg/ml) usando agujas de diferente calibre.

Tampón PEG:

55

PEG 4.000 al 20% m/v

12 mg/ml de manitol

0,1 mg/ml de polisorbato 80

1,305 mg/ml de ácido cítrico monohidrato

60

0,305 mg/ml de citrato sódico

1,53 mg/ml de hidrogenofosfato disódico deshidratado

0,86 mg/ml de dihidrogenofosfato sódico deshidratado

el pH se ajustó a 5,2 con hidróxido sódico

65 La reducción de la jeringa (volumen de llenado de 1 ml) se realizó como lo haría manualmente un paciente en el transcurso de la administración. Se evaluaron tamaños de aguja 20 - 27,5 G.

Jeringas:

20 / 23 / 26G:

5 Jeringas Henke Sass Wolf GmbH de 1 ml Norm-Ject, equipadas con

- agujas Henke Sass Wolf GmbH Fine-Ject® 20G
- agujas Terumo® 23G
- agujas Neopoint® 26G

10

27,5G:

Jeringas largas BD HyPak SCF™ de 1 ml, equipadas con agujas 27,5G RNS 38800 Le Pont du Claix

15 Los resultados (Figura 6) sugieren que las agujas de mayor calibre proporcionan un suministro más lento de los cristales a elevadas concentraciones.

I. Datos de estabilidad (SE HPLC, FT-IR)

20 En la siguientes sección, se realizaron experimentos para determinar la estabilidad de suspensiones cristalinas de anticuerpo monoclonal D2E7 (50 y 200 mg/ml) en almacenamiento de 12 meses a 2-8°C.

Los cristales se suspendieron en el medio usado en los estudios de capacidad inyectable:

- 25 PEG 4.000 al 20% m/v
 12 mg/ml de manitol
 0,1 mg/ml de polisorbato 80
 1,305 mg/ml de ácido cítrico monohidrato
 0,305 mg/ml de citrato sódico
- 30 1,53 mg/ml de hidrogenofosfato disódico deshidratado
 0,86 mg/ml de dihidrogenofosfato sódico deshidratado
 el pH se ajustó a 5,2 con hidróxido sódico

SE-HPLC

35

Suspensión de cristales de 50 mg/ml de Adalimumab, estable a 2-8°C en el tiempo			
Momento temporal	Agregados (%)	Monómero (%)	Fragmentos (%)
T0	1,3	98,5	0,2
1 mes	1,4	98,3	0,3
3 meses	2,2	97,5	0,3
6 meses	3,2	96,3	0,5
9 meses	4,0	95,5	0,5
12 meses	4,2	95,1	0,7
200 mg/ml de Adalimumab			
Momento temporal	Agregados (%)	Monómero (%)	Fragmentos (%)
T0	1,3	98,5	0,2
1 mes	1,3	98,4	0,3
3 meses	1,9	97,8	0,3
6 meses	2,4	97,2	0,4
9 meses	2,5	97,0	0,5
12 meses	2,6	96,8	0,6

40 Se usó un sistema Dionex HPLC (bomba P680, tomamuestras automático ASI 100, UVD170U) para el análisis de estabilidad por SEC. Las muestras de D2E7 se separaron en una columna GE Superose® 6, aplicando un caudal de 0,5 ml/min. La cuantificación UV (detección) se realizó a una longitud de onda de 214 nm. El tampón de procesamiento constaba de cloruro sódico 0,15 M en tampón fosfato sódico 0,02 M pH 7,5. Los espectros IR se registraron con un sistema Confocheck en un Bruker Optics Tensor 27. Las muestras líquidas se analizaron usando una célula MicroBiology AquaSpec. Cada muestra se evaluó realizando al menos dos mediciones de 120 a 500 escaneos a 25°C. Los espectros del tampón blanco se sustrajeron de los espectros de proteína, respectivamente. Se generaron espectros de segunda derivada de la proteína por transformación de Fourier y el vector se normalizó a

partir de 1580-1720 cm⁻¹ para la comparación relativa. La redisolución de los cristales se realizó del siguiente modo: Las suspensiones de cristales se diluyeron con tampón comercial Humira® hasta 10 mg/ml de concentración de proteína. Disminuyendo la concentración de PEG se redisolieron los cristales.

Azul - patrón, Humira después de congelación/descongelación

5 Rojo - cristales redisueltos después de 6 meses de almacenamiento a 25°C, 50 mg/ml

Verde - cristales redisueltos después de 6 meses de almacenamiento a 25°C, 200 mg/ml

Resultados: La Figura 7 ilustra que no hubo diferencias conformacionales tras 6 meses de almacenamiento a 25°C

J. Morfología

10 Después de 12 meses de almacenamiento a 2-8°C no se observaron cambios morfológicos significativos por análisis de microscopía óptica de los cristales.

15 Se pipetearon alícuotas de 1 a 10 µl de volumen de muestra en una placa portaobjetos, se diluyeron con tampón de formulación (PEG al 20%) y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio. Las preparaciones se evaluaron usando un microscopio óptico invertido Zeiss Axiovert 25 equipado con oculares E-PI 10x y objetivos 10x, 20x y 40x, respectivamente.

Referencias:

- 20 Baldock Peter; Mills, Vaughan; Stewart, Patrick Shaw, *Journal of Crystal Growth* (1996), 168(1-4, Crystallization of Biological Macromolecules), 170-174.
- Connell, G. E., M. H. Freedman, et al. (1973). "Human IgG myeloma protein crystallizing with rhombohedral symmetry." *Canadian Journal of Biochemistry* 51(8): 1137-41.
- 25 Harris, L. J., S. B. Larson, et al. (1992). "The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma." *Nature (Londres, Reino Unido)* 360(6402): 369-72.
- Huber, R., J. Deisenhofer, et al. (1976). "Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment." *Nature* 264(5585): 415-20.
- Jen, A., Merkle, H. P. (2001), *Diamonds in the rough: Protein Crystals from a formulation perspective*, *Pharm. Res.* (2001), 18, 11, 1483
- 30 Jentoft, J. E., D. G. Dearborn, et al. (1982). "Characterization of a human cryoglobulin complex: a crystalline adduct of a monoclonal IgG and albumin." *Biochemistry* 21(2): 289-294.
- Jones, H. B. (1848). "On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium." *Philosophical Transactions of the Royal Society, Londres* 138: 55-62.
- 35 McPherson, A. (1999). *Crystallization of Biological Macromolecules*. Cold Spring Harbor, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mills, L. E., L. R. Brettman, et al. (1983). "Crystalloglobulinemia resulting from human monoclonal antibodies to albumin." *Annals of internal medicine* 99(5): 601-4.
- Nisonoff, A., S. Zappacosta, et al. (1968). "Properties of crystallized rabbit anti-p-azobenzoate antibody." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 32: 89-93.
- 40 Putnam, F. W. (1955). "Abnormal human serum globulins." *Science (Washington, DC, Estados Unidos)* 122: 275-7.
- Rajan, S. S., K. R. Ely, et al. (1983). "Three-dimensional structure of the Mcg IgG 1 immunoglobulin." *Molecular Immunology* 20(7): 787-99.
- 45 Sarma, V. R., E. W. Silverton, et al. (1971). "Three-dimensional structure at 6 Ang. Resolution of a human gG1 immunoglobulin molecule." *Journal of Biological Chemistry* 246(11): 3753-9.
- Shenoy, B., C. P. Govardhan, et al. (2002). *Pharmaceutical compositions comprising crystals of polymeric carrier-stabilized antibodies and fragments for therapeutic uses*. Sol. Int. PCT WO, (Altus Biologics Inc., EEUU). 173 pág.
- 50 Terry, W. D., B. W. Matthews, et al. (1968). "Crystallographic studies of a human immunoglobulin." *Nature* 220(164): 239-41.
- von Bonsdorff, B., H. Groth, et al. (1938). "On the Presence of a High-molecular Crystallizable Protein in Blood Serum in Myeloma." *Folia Haematologia* 59: 184-208.
- 55 Yang, M.X., B. Shenoy, et al. (2003). "Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(12): 6934-6939.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 60 <110> Abbott Biotechnology Ltd.
- <120> Anticuerpos cristalinos anti-hTNF alfa
- <130> 8216
- 65 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> región variable de cadena ligera de D2E7

<400> 1

```

    Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
    1              5              10              15

    Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
              20              25              30

    Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
              35              40              45

    Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
              50              55              60

    Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
    65              70              75              80

    Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
              85              90              95

    Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
              100              105
  
```

<210> 2
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> región variable de cadena pesada de D2E7

<400> 2

ES 2 442 258 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> región CDR3 de cadena ligera de D2E7

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es Thr o Ala

<400> 3

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
 1 5

20 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>

ES 2 442 258 T3

<223> región CDR3 de cadena pesada de D2E7

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (12)..(12)

<223> Xaa es Tyr o Asn

<400> 4

10 Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
1 5 10

<210> 5

<211> 214

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de cadena ligera de D2E7

20 <400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

ES 2 442 258 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

5 <210> 6
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> secuencia de cadena pesada de D2E7
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (451)..(451)
<223> Xaa está ausente o es Lys

15 <400> 6

ES 2 442 258 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

ES 2 442 258 T3

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

ES 2 442 258 T3

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Xaa
450

REIVINDICACIONES

1. Un método de cristalización discontinua para cristalizar un anticuerpo IgG humano anti-hTNF alfa, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 (a) proporciona una solución acuosa del anticuerpo en mezcla con una sal de fosfato inorgánico para obtener una mezcla acuosa de cristalización, donde la mezcla acuosa de cristalización tiene una concentración de sal de fosfato inorgánico de 1 M a 6 M; y
- 10 (b) incubar la mezcla acuosa de cristalización hasta que se formen cristales del anticuerpo, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.
- 15 2. El método de cristalización de acuerdo con la reivindicación 1, donde el pH de dicha mezcla acuosa de cristalización está en el intervalo de pH 3 a 5.
3. El método de cristalización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la mezcla acuosa de cristalización contiene un tampón.
- 20 4. El método de cristalización de acuerdo con la reivindicación 3, donde el tampón comprende un tampón acetato.
5. El método de cristalización de acuerdo con la reivindicación 4, donde el tampón comprende acetato sódico.
- 25 6. El método de cristalización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde la concentración de tampón en la mezcla acuosa de cristalización es de 0 M a 0,5 M.
7. El método de cristalización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la sal de fosfato es una sal de hidrogenofosfato.
- 30 8. El método de cristalización de acuerdo con la reivindicación 7, donde la sal de fosfato es una sal de metal alcalino, o una mezcla de al menos dos sales diferentes de metal alcalino.
9. El método de cristalización de acuerdo con la reivindicación 1, donde la concentración de la sal de fosfato inorgánico en la mezcla de cristalización está en el intervalo de 1,0 a 3,0 M.
- 35 10. El método de cristalización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde se cumple al menos una de las siguientes condiciones adicionales de cristalización:
- 40 a) la incubación se realiza durante entre 1 hora a 60 días;
- b) la incubación se realiza a una temperatura entre 4°C y 37°C;
- c) la concentración del anticuerpo está en el intervalo de 0,5 a 100 mg/ml.
- 45 11. El método de cristalización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente la etapa de secar los cristales y/o intercambiar las aguas madre con un tampón diferente.
12. El método de cristalización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el volumen del lote está en el intervalo de 1 ml a 20000 l.
- 50 13. Un cristal de un anticuerpo IgG humano anti-hTNF alfa aislado e intacto, que se puede obtener mediante un método de cristalización definido en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.
- 55 14. El cristal de acuerdo con la reivindicación 13, donde el cristal tiene una morfología de tipo aguja con una longitud máxima de 2 - 500 μm y una proporción l/d de 3 a 30.
- 60 15. El cristal de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, donde el anticuerpo es un anticuerpo no glucosilado.
16. El cristal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13, 14, o 15, donde el anticuerpo IgG se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo IgG1, un anticuerpo IgG2, un anticuerpo IgG3 y un anticuerpo IgG4.
- 65 17. El cristal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde el anticuerpo es D2E7 (adalimumab).

18. Una composición farmacéutica que comprende: (a) cristales del anticuerpo humano anti-hTNF alfa definido en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, y (b) al menos un excipiente farmacéutico; proporcionándose dicha composición como una formulación sólida, semisólida o líquida, conteniendo cada formulación el anticuerpo en forma cristalina.
- 5 19. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 18, donde el al menos un excipiente integra o encapsula los cristales del anticuerpo.
- 10 20. La composición de acuerdo con la reivindicación 18, donde la composición tiene una concentración de anticuerpo mayor de 1 mg/ml.
21. La composición de acuerdo con la reivindicación 18, donde la composición tiene una concentración de anticuerpo mayor de 200 mg/ml.
- 15 22. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde el excipiente comprende al menos un vehículo polimérico opcionalmente biodegradable o al menos un vehículo oleoso o lípido.
- 20 23. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 18, donde el anticuerpo está en una concentración en el intervalo de 10 a 400 mg/ml.
24. Una suspensión de cristales que comprende los cristales del anticuerpo humano anti-hTNF alfa definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, teniendo la suspensión de cristales una concentración de anticuerpo mayor de 100 mg/ml.
- 25 25. Un cristal que comprende el anticuerpo humano anti-hTNF alfa aislado definido en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 para su uso en el tratamiento de un mamífero mediante la administración al mamífero de una cantidad eficaz del anticuerpo cristalino anti-hTNF alfa.
- 30 26. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22 para su uso en el tratamiento de un mamífero mediante la administración al mamífero de una cantidad eficaz de la composición.
27. La composición de acuerdo con la reivindicación 26, donde la composición se administra por vía parenteral, vía oral, o por inyección.
- 35 28. Cristales de anticuerpo definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con TNF alfa en un sujeto, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los cristales de anticuerpo, donde dicho trastorno se selecciona entre el grupo que consiste en una enfermedad autoinmune, en particular artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis y artritis gotosa, una alergia, esclerosis múltiple, diabetes autoinmune, uveítis autoinmune y síndrome nefrótico; una enfermedad infecciosa, rechazo de trasplante o enfermedad de injerto contra hospedador, neoplasia, trastorno pulmonar, trastorno intestinal, trastorno cardiaco, trastornos óseos inflamatorios, enfermedad de resorción ósea, hepatitis alcohólica, hepatitis vírica, hepatitis fulminante, alteraciones de la coagulación, quemaduras, lesión por reperfusión, formación de queloides, formación de tejido cicatrizal, pirexia, enfermedad periodontal, obesidad y toxicidad por radiación; una espondiloartropatía, un trastorno pulmonar, un trastorno coronario, un trastorno metabólico, anemia, dolor, un trastorno hepático, un trastorno cutáneo, un trastorno de las uñas, o vasculitis, enfermedad de Behcet, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), fibrosis pulmonar idiopática (IPF), reestenosis, diabetes, anemia, dolor, un trastorno relacionado con la enfermedad de Crohn, artritis reumatoide juvenil (JRA), una infección por el virus de la hepatitis C, psoriasis, artritis psoriásica, y psoriasis con placas crónicas, caquexia relacionada con la edad, enfermedad de Alzheimer, edema cerebral, lesión cerebral inflamatoria, síndrome de fatiga crónica, dermatomiositis, reacciones a fármacos, edema en y/o alrededor de la medula espinal, fiebres periódicas familiares, síndrome de Felty, fibrosis, glomerulonefritis (por ejemplo, glomerulonefritis posterior a estreptococos o nefropatía por IgA), pérdida de prótesis, poliangiitis microscópica, trastorno de tejido conectivo mixto, mieloma múltiple, cáncer y caquexia, trastorno orgánico múltiple, síndrome mielodisplásico, orquitis, osteólisis, pancreatitis, incluyendo abscesos agudos, crónicos y pancreáticos, enfermedad periodontal, polimiositis, fallo renal progresivo, pseudogota, pioderma gangrenoso, policondritis recidivante, enfermedad cardíaca reumática, sarcoidosis, colangitis esclerosante, apoplejía, reparación de aneurisma aórtico toracoabdominal (TAAA), síndrome periódico asociado al receptor de TNF (TRAPS), síntomas relacionados con vacunación de fiebre amarilla, enfermedades inflamatorias asociadas con el oído, inflamación crónica del oído, o inflamación pediátrica del oído, uveítis, ciática, prostatitis, endometriosis, neovascularización coroidal, lupus, síndrome de Sjogren, y degeneración macular húmeda.
- 60 29. Un cristal que comprende el anticuerpo humano anti-hTNF alfa aislado definido en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 para su uso en medicina.
- 65 30. Una composición que comprende el cristal de la reivindicación 13, donde dicha composición comprende más del 95% de cristales del anticuerpo humano anti-hTNF alfa.

31. La composición de acuerdo con la reivindicación 30, donde el anticuerpo es D2E7 (adalimumab).



Fig. 1



Fig. 2

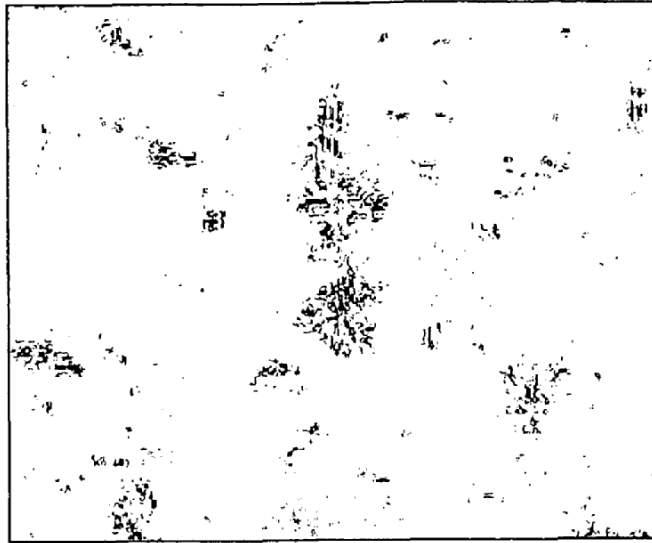


Fig. 3



Fig. 4

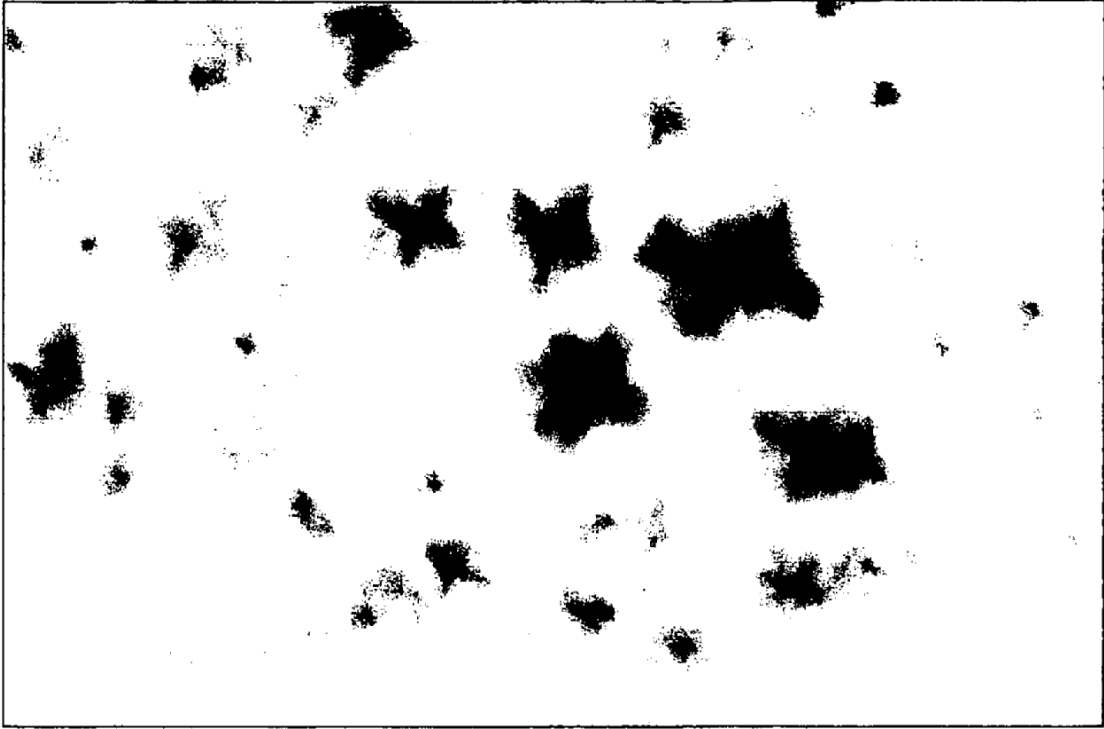


Fig. 5A

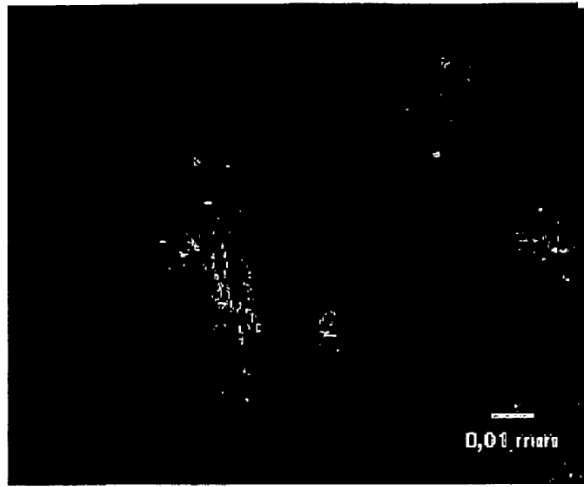


Fig. 5B

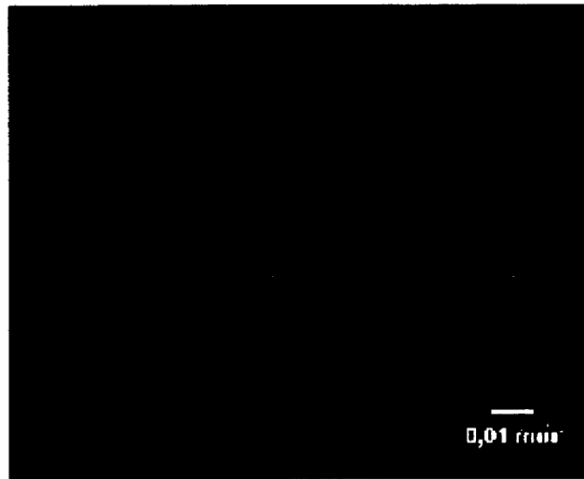


Fig. 5C

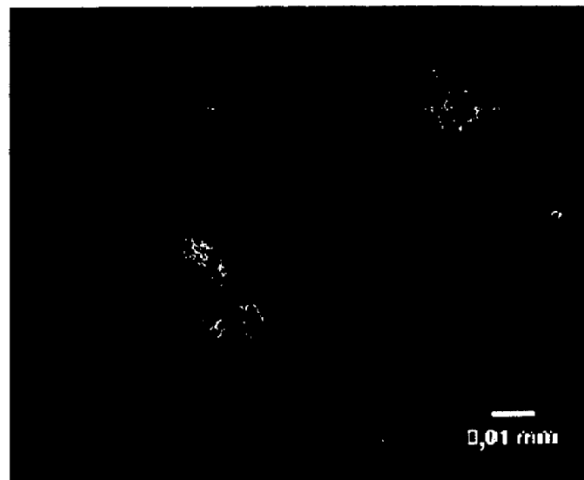


Fig. 5D

Tiempo de reducción para 1 ml de suspensión de cristales de D2E7 (tampón PEG al 20%)

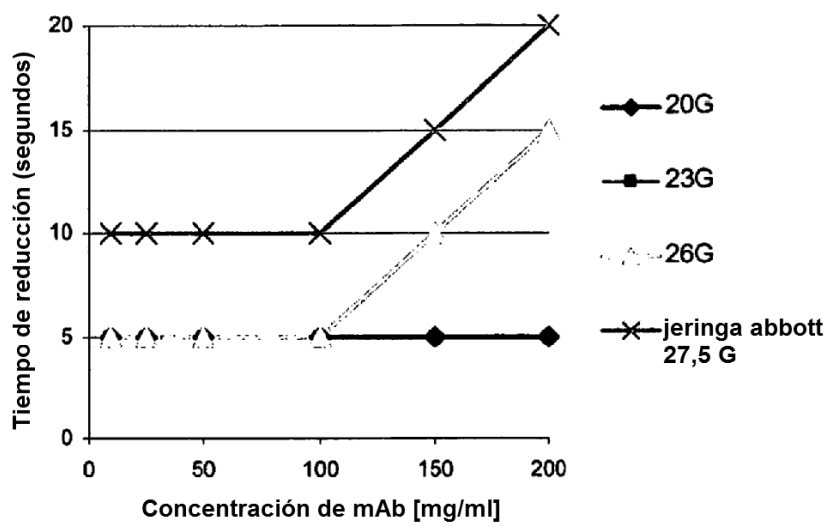
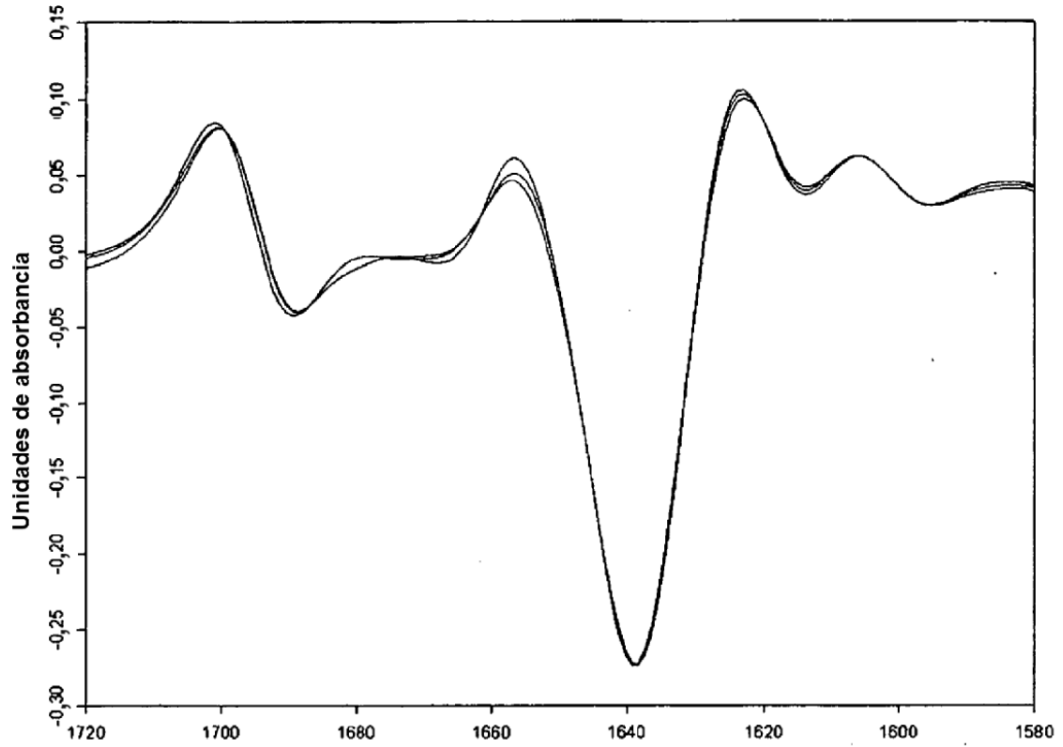


Fig. 6

FT-IR

C:\Datos\Stefani\StabStudy\T6 25°C\ID2E7 xtals 200 mg mL 25°C T6 A V.0 10.10.2007 16:23:12



Página 1 de 1

Fig. 7