

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 155**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2005 E 05781605 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 1771476**

54 Título: **Cristalización de anticuerpos anti-VEGF**

30 Prioridad:

23.07.2004 US 590707 P

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

11.03.2015

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**HAGEWIESCHE, ANNETTE, MARIE, CLASEN;
FUKAMI, JULIE;
CROMWELL, MARY, E.M. y
DINGES, RACHEL, BULOTSKY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 531 155 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

Cristalización de anticuerpos anti-VEGF

5 Antecedentes de la invención

Los anticuerpos monoclonales se están convirtiendo en poderosos agentes terapéuticos en el tratamiento de varias enfermedades y afecciones, que incluyen, pero no se limitan a, cáncer, enfermedades respiratorias, enfermedades inflamatorias y enfermedades infecciosas. Generalmente, las terapias que incluyen anticuerpos requieren la administración de entre 100 mg y 1 g de anticuerpo por dosis. Un enfoque comúnmente usado para tales tratamientos es usar infusiones intravenosas de aproximadamente 2 a 20 ml de una solución de 50 mg/ml del anticuerpo. Debido a que se desean métodos de introducción distintos de la administración intravenosa, tales como inyección subcutánea, sería ventajoso tener soluciones más concentradas de los anticuerpos. Sin embargo, soluciones concentradas de los anticuerpos pueden conducir a problemas, que incluyen, pero no se limitan a, soluciones altamente viscosas, agregación de proteínas y problemas con la estabilidad de las soluciones.

Se han cristalizado fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, para su uso en cristalografía de rayos X. Procedimientos previamente informados de la cristalización de anticuerpos monoclonales han usado generalmente la técnica de difusión de vapor. Los inconvenientes de esta técnica incluyen las mínimas cantidades de cristales que se producen, y el uso de agentes que en algunos casos son inaceptables para su uso en seres humanos. También pueden usarse métodos de procesos en lotes para producir cantidades ligeramente mayores de cristales. Los métodos de procesos en lotes comúnmente usados normalmente utilizan precipitantes orgánicos o poliméricos. Se han descrito protocolos que utilizan precipitantes orgánicos para cristalizar anticuerpos. Yang y col., PNAS, vol. 100, N° 12, pág. 6934-6939 (2003); Kuznetsov y col., J. Crystal Growth, vol. 232, pág. 30-39 (2001); Kuznetsov y col., J. Structural Biology, vol. 131, pág. 108-115 (2000); Harris y col., Immunological Reviews, vol. 163, pág. 35-43 (1998); Harris y col., J. Mol. Biol., vol. 275, pág. 861-872, (1998); y Harris y col., Proteins, vol. 23, pág. 285-89 (1995). Ejemplos de precipitantes orgánicos o poliméricos comúnmente usados incluyen polietilenglicol (PEG), isopropanol, Jeffamine® (Huntsman Petrochemical Corp., Sal Lake City, UT) y (+/-)-2-metil-2,4-pentanodiol (MPD).

Como muchos anticuerpos se procesan ahora a gran escala para la administración a seres humanos, se desea tener métodos de formación de cristales y/o geles de proteína concentrados a gran escala, especialmente aquellos que no incluyen precipitantes orgánicos o poliméricos. Los cristales y/o geles son útiles para almacenamiento y administración terapéuticamente.

35 Sumario de la invención

La invención proporciona métodos, como se definen en las reivindicaciones, de producción de cristales de bevacizumab adecuados para aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico.

Un aspecto de la invención proporciona un método de producción de cristales del anticuerpo que incluye las etapas de poner en contacto el anticuerpo con una solución que incluye 1 a 500 milimolar (mM) de cloruro de cinc ($ZnCl_2$) y tampón acetato sódico 1 a 100 mM (NaOAc); e incubar el anticuerpo y la solución hasta que se forman cristales del anticuerpo.

En algunas realizaciones, un método comprende poner en contacto el anticuerpo con una solución que comprende cloruro de cinc 1 a 120 mM; e incubar el anticuerpo y la solución hasta que se forman cristales del anticuerpo. En algunas realizaciones, la incubación es a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 20 a 27 °C. En otras realizaciones, la incubación es inferior a una temperatura de aproximadamente 20 °C, preferentemente de aproximadamente 0 a 20 °C, más preferentemente aproximadamente 0 a 10 °C.

En algunas realizaciones, un método comprende poner en contacto el anticuerpo o fragmento del mismo con una solución que comprende $ZnCl_2$ y tampón NaOAc e incubar el anticuerpo y la solución hasta que se forman cristales del anticuerpo.

Un método de producción de cristales del anticuerpo incluye poner en contacto el anticuerpo con una solución que incluye cloruro de cinc y carece de otros precipitantes; e incubar el anticuerpo y la solución hasta que se forman cristales del anticuerpo.

En algunas realizaciones, la solución comprende cloruro de cinc ($ZnCl_2$) 10 a 80 mM, más preferentemente 25 mM a 60 mM. En otras realizaciones, el tampón es NaOAc 1 a 20 mM, más preferentemente acetato sódico (NaOAc) 25 a 75 mM. En algunas realizaciones, la solución comprende $ZnCl_2$ superior a 10 mM y NaOAc superior a 5 mM. Por ejemplo, la solución comprende $ZnCl_2$ 100 mM y NaOAc 10 mM. En otras realizaciones, el tampón tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9, más preferentemente de aproximadamente 4,7 a 5,7.

65

También se desvela un cristal de un anticuerpo o fragmento del mismo producido mediante los métodos descritos en el presente documento. Los anticuerpos pueden ser un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, anticuerpo quimérico, anticuerpo biespecífico, anticuerpo humano o anticuerpo humanizado.

5 También se desvela una composición que incluye un cristal o un gel de proteína de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo anti-VEGF, anti-CD20, anti-CD11a, anti-CD40, anti-Apo-2, anti-HER2, anti-IgE y fragmentos de los mismos, y un vehículo. Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos glucosilados de longitud completa.

10 También se desvela una formulación que incluye un cristal o gel de proteína de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anti-VEGF, anti-Apo-2, anti-CD20, anti-CD11a, anti-CD40, anti-HER2, anti-Apo-2, anti-IgE y fragmentos de los mismos, y al menos un componente.

15 También se desvela un método de tratamiento de una afección en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de una de las composiciones o formulaciones anteriores. Las condiciones incluyen aquellas que están asociadas a VEGF, CD20, CD11a, CD40, Apo-2 y HER2.

20 También se desvela un artículo de fabricación que incluye al menos una de las composiciones o formulaciones anteriores y un recipiente.

También se desvelan métodos, composiciones y formulaciones, útiles, entre otras cosas, para concentrar, purificar, guardar y administrar anticuerpos o fragmentos de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 es una gráfica que muestra la solubilidad de anti-VEGF en concentraciones variables de $ZnCl_2$ y NaOAc, pH 5,7, temperatura ambiente. La gráfica muestra la concentración de anti-VEGF soluble representada en función de la concentración de $ZnCl_2$ y concentraciones de NaOAc. Se muestran diferentes concentraciones de NaOAc del siguiente modo: x NaOAc 10 mM; Δ NaOAc 25 mM (línea blanca); \blacklozenge NaOAc 50 mM; \blacksquare NaOAc 75 mM; * NaOAc 100 mM.

La Figura 2a es una imagen a 200x aumentos de cristales de anti-VEGF formados en presencia de $ZnCl_2$ 5 mM y NaOAc 100 mM, pH 5,7 bajo luz no birrefringente.

35 La Figura 2b es una imagen a 200x aumentos de cristales de anti-VEGF formados en presencia de $ZnCl_2$ 5 mM y NaOAc 100 mM, pH 5,7, bajo luz birrefringente.

La Figura 2c es una imagen a 200x aumentos de cristales de anti-VEGF formados en presencia de $ZnCl_2$ 25 mM y NaOAc 10 mM, pH 5,7, bajo luz no birrefringente.

40 La Figuras 2d es una imagen a 200x aumentos de cristales de anti-VEGF formados en presencia de $ZnCl_2$ 25 mM y NaOAc 10 mM, pH 5,7, bajo luz birrefringente.

45 La Figura 2e es una imagen a 200x aumentos de cristales de anti-VEGF formados en una solución de $ZnCl_2$ 10 mM, NaOAc 100 mM, pH 5,7, bajo luz no birrefringente.

La Figura 2f es una imagen a 200x aumentos de cristales de anti-VEGF formados en una solución de $ZnCl_2$ 10 mM, NaOAc 100 mM, pH 5,7, bajo luz birrefringente.

50 La Figura 3 muestra el mapa de fases para la condición estática generada representando la concentración de $ZnCl_2$ contra la concentración de NaOAc. Los siguientes símbolos identifican \blacklozenge cristales libres; \blacksquare transiciones de fase; Δ cristales en gel (triángulos blancos).

55 La Figura 4 muestra el mapa de fases de condiciones de mezcla frente a estáticas. Los símbolos representan lo siguiente: \diamond mezcla libre; \blacklozenge mezcla de gel; $--\blacklozenge--$ mezcla de transición; $--\blacksquare--$ estática de transición; \square estática libre; y \blacksquare estática del gel.

60 La Figura 5 muestra SDS-PAGE de cristales de anti-VEGF que se aislaron, lavaron y resolubilizaron. El carril 1 son los marcadores de peso molecular; el carril 2 es 5 μ g de anti-VEGF; el carril 3 está vacío; el carril 4 es el sobrenadante; el carril 5 es el lavado 1, agua de cristalización; el carril 6 es el lavado 2, agua de cristalización; el carril 7 es el lavado 3, agua de cristalización; el carril 8 está vacío; el carril 9 es 1 ml de cristal (disuelto en agua); el carril 10 es 5 ml de cristal (disuelto en agua); el carril 11 es 10 ml de cristal (disuelto en agua); el carril 12 es 15 ml de cristal (disuelto en agua); el carril 13 es 20 ml de cristal (disuelto en agua).

65 La Figura 6 muestra adiciones de precipitantes para las condiciones de cristalización de anti-VEGF $ZnCl_2$ 10

mM, NaOAc 10 mM, pH 5,7. La cantidad de anti-VEGF soluble se representó contra el % de precipitante añadido.

5 La Figura 7 muestra el análisis de espectroscopía de masas de la solución madre de anti-VEGF (D), soluciones de cristales de anti-VEGF (A, C) y solución de lavado de cristales (B). La cadena ligera reducida de anti-VEGF tiene una masa de aproximadamente 23,449 D.

Descripción detallada de la realización preferida

10 Definiciones

15 Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos madurados por afinidad, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos multivalentes humanizados y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos mientras que presentan la actividad biológica deseada), mientras que presentan la actividad biológica deseada.

20 Un anticuerpo de longitud completa comprende cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas idénticas (H) y dos cadenas ligeras idénticas (L) conectadas entre sí por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende un dominio de la región variable de la cadena pesada (V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende un dominio de la región variable de la cadena ligera (V_L) y un dominio de la región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio, C_L . Los dominios V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de complementariedad (CDR) o bucles hipervariables (HVL), intercalados con regiones que están más conservadas, llamadas regiones estructurales (FR). Cada V_H y V_L normalmente está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

30 Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgA-1, IgA-2, y etc. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas y se describen generalmente en, por ejemplo, Abbas y col., Cellular and Mol. Immunology, 4^a ed. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una proteína de fusión mayor, formada por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o varias de otras proteínas o péptidos.

40 Las cadenas ligeras de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

45 El término "anticuerpo de longitud completa" se refiere a un anticuerpo que en su forma sustancialmente intacta incluye al menos 2 cadenas pesadas y 2 ligeras, no fragmentos de anticuerpos como se definen más adelante. El término se refiere particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contiene la región Fc. Un anticuerpo de longitud completa puede ser un anticuerpo de secuencia nativa o un anticuerpo recombinante. Un anticuerpo de longitud completa puede ser humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

50 El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son esencialmente idénticos, excepto por variantes que pueden producirse durante la producción del anticuerpo.

55 Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presentan la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. N° 4.816.567; y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

65 Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las que los residuos de una CDR o bucle hipervariable (HVL) del receptor están sustituidos con residuos de una CDR o HVL de una especie no humana

(anticuerpo del donante) tal como ratón, rata, conejo o humano no primate que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen con residuos no humanos correspondientes para mejorar la afinidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo del receptor o el anticuerpo del donante. Estas modificaciones pueden hacerse para mejorar la afinidad del anticuerpo o actividad funcional. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables se corresponden con aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanizados también pueden producirse como fragmentos de unión al antígeno como se describe en el presente documento. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de o derivada de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véanse Jones y col., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en su interior: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler y Gross, *Curr. Op. Biotech* 5:428-433 (1994).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha hecho usando cualquiera de las técnicas de preparación de anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables que producen una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee aquella(s) alteración (alteraciones). Anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante métodos conocidos en la técnica. Marks y col., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad por barajado de dominios de VH y VL. La mutagénesis al azar de CDR y/o residuos de la región estructural se describe por: Barbas y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Scier y col., *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton y col., *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson y col., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins y col., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden solo una porción de un anticuerpo intacto, que generalmente incluye un sitio de unión al antígeno del anticuerpo intacto y que así retiene la capacidad para unirse al antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos englobados por la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene dominios VL, CL, VH y CH1 que tienen un enlace disulfuro entre cadenas entre la cadena pesada y ligera; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CH1; (iii) el fragmento Fd que tiene dominios VH y CH1; (iv) el fragmento Fd' que tiene dominios VH y CH1 y uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CH1; (v) el fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb que consiste en un dominio VH; (vii) anticuerpos sin bisagra que incluyen al menos los dominios VL, VH, CL, CH1 y que carecen de la región bisagra; (viii) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' ligados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, Fv monocatenario; scFv); (x) "diacuerpos" con dos sitios de unión al antígeno, que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos; (xi) "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión al antígeno.

Como se usa en el presente documento, "cristal" se refiere a una forma de un estado sólido de materia en el que los átomos están dispuestos en un patrón que se repite periódicamente en tres dimensiones, formando normalmente una red cristalina.

Como se usa en el presente documento, "gel" se refiere a una forma concentrada de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es una solución viscoelástica que es más sólida que una solución coloidal líquida. Opcionalmente, los geles pueden comprender cristales. Los geles que se forman usando los métodos de la invención generalmente contienen una alta concentración de anticuerpo o fragmentos del mismo y, opcionalmente, pueden comprender cristales.

"Precipitante", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente que hace que un compuesto o molécula se vuelva insoluble. En algunos casos, el compuesto o molécula forma un cristal. Los precipitantes que pueden usarse para formar cristales de compuestos o moléculas son, normalmente, sales, polímeros o moléculas orgánicas. Los precipitantes orgánicos incluyen isopropanol, etanol, hexanodiol y 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD). Los precipitantes poliméricos incluyen polietilenglicol y poliaminas tales como Jeffamine®. Las sales usadas incluyen sulfato de amonio, citrato de sodio, acetato sódico, cloruro de amonio, cloruro sódico y formiato de magnesio, normalmente a concentraciones de 0,2 M o superiores.

Un "trastorno" o "afección" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Éste incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos que van a tratarse en el presente documento incluyen tumores malignos y benignos, tumores malignos no leucémicos y linfoides; trastornos neuronales, de la glía, astrocíticos, hipotalámicos y otros glandulares, de macrófagos, epiteliales, del estroma y blastocélulas; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" se refiere a intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo o célula que está tratándose. Efectos deseables del tratamiento incluyen alivio de síntomas, reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión o pronóstico mejorado.

Modos para llevar a cabo la invención

El anticuerpo y fragmentos de anticuerpos se han convertido en muy útiles, especialmente terapéuticamente. Muchos anticuerpos están ahora siendo investigados para uso terapéutico. El uso terapéutico requiere frecuentemente la producción a gran escala de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Un aspecto de la invención, como se define en las reivindicaciones, incluye un método de concentración, purificación y almacenamiento de anticuerpos, especialmente aquellos producidos a gran escala. Los métodos de la invención proporcionan cristales.

Los cristales de anticuerpos o fragmentos de los mismos son útiles, por ejemplo, para la caracterización de la estructura tridimensional mediante difracción de rayos X, para almacenamiento, para concentración, para purificación y para administración de anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Muchas proteínas, debido a su tamaño y sus configuraciones tridimensionales, pueden ser difíciles de cristalizar. Normalmente, deben cribarse varias combinaciones de precipitantes, tampones y pH con el fin de identificar la combinación de condiciones que proporcionará la cristalización. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos han sido especialmente difíciles de cristalizar debido a su tamaño y el hecho de que la región bisagra hace la molécula más flexible y menos rígida. Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden estar glucosilados dependiendo de la fuente del anticuerpo.

En algunas realizaciones, un método comprende poner en contacto un anticuerpo con una solución que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una sal de un catión divalente. En algunas realizaciones, la presencia de una sal de catión divalente es a baja concentración, por ejemplo, 1 a 500 mM. Una solución también puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en un tampón, tal como acetato sódico. En algunas realizaciones, el tampón tiene una baja fuerza iónica, por ejemplo, 1 a 100 mM. Según la invención, los cationes divalentes son cinc o magnesio. Aunque no se pretende limitar la invención de ningún modo, la sal del catión divalente está actuando de precipitante y contribuye a la formación de cristales de proteína. En algunos casos, la solución no incluye otros precipitantes, tales como precipitantes orgánicos o poliméricos.

En algunas realizaciones, un método comprende poner en contacto un anticuerpo con una solución que comprende una sal de cinc. En algunas realizaciones, la presencia de una sal de cinc es a baja concentración, por ejemplo, 1 a 120 mM, preferentemente 10 a 80 mM, y más preferentemente 25 a 60 mM. Según la invención, la sal de cinc es $ZnCl_2$. Una solución puede comprender un tampón, tal como acetato sódico. En algunas realizaciones, el tampón tiene una fuerza iónica baja, por ejemplo, 1 a 100 mM, preferentemente 1 a 20 mM, y más preferentemente, 25 mM a 75 mM. En algunas realizaciones, la solución comprende $ZnCl_2$ 100 mM y NaOAc 10 mM. En algunos casos, la solución no incluye otros precipitantes, tales como precipitantes orgánicos o poliméricos. Los métodos proporcionan la formación de cristales y/o geles de proteína. Opcionalmente, los geles de proteína pueden comprender cristales.

En algunas realizaciones, la solución comprende $ZnCl_2$ superior a 10 mM y NaOAc superior a 5 mM. En otras realizaciones, la solución comprende $ZnCl_2$ 100 mM y NaOAc 10 mM.

En algunas realizaciones como se definen en las reivindicaciones, un método comprende poner en contacto un anticuerpo con una solución que comprende cloruro de magnesio y tampón Tris. En algunos casos, la solución no incluye otros precipitantes, tales como precipitantes orgánicos o poliméricos. El pH de la solución es alto, aproximadamente 9. Los métodos proporcionan la formación de cristales, que incluyen geles de proteína que comprenden cristales.

En algunas realizaciones, un método comprende poner en contacto el anticuerpo con una solución que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en cloruro de cinc para formar un gel de proteína que comprende cristales. En algunas realizaciones, el cloruro de cinc está a una concentración baja, por ejemplo, 1 a 120 mM. Una solución puede comprender un tampón, tal como acetato sódico. En algunas realizaciones, el tampón tiene una fuerza iónica baja, por ejemplo, 1 a 100 mM. En algunos casos, la solución no incluye otros precipitantes, tales como precipitantes orgánicos o poliméricos.

Los métodos de la invención proporcionan una forma de bajo coste de cristalizar, concentrar o purificar anticuerpo. En algunos casos, los métodos de la invención proporcionan métodos que no incluyen el uso de otros precipitantes, tales como polímeros o precipitantes orgánicos que podrían ser no deseables en el producto. Pueden combinarse cristales y/o geles de proteína de anticuerpo o fragmentos de anticuerpos con vehículos u otros componentes para almacenamiento y/o para administración.

Anticuerpos

Bevacizumab se usa en los métodos de la invención.

En algunos casos, los anticuerpos se producen como anticuerpos de longitud completa. Los anticuerpos de longitud completa comprenden normalmente 2 cadenas pesadas y 2 ligeras.

Los fragmentos de anticuerpos comprenden fragmentos de unión al antígeno e incluyen Fab, Fab', Fab₂, Fab'₂, Fd, Fv monocatenario, scFv₂, dAb, anticuerpos sin bisagra, diacuerpos y anticuerpos lineales.

Dependiendo de la fuente del anticuerpo o fragmento del mismo, los anticuerpos pueden estar glucosilados. Normalmente, los anticuerpos recombinantes obtenidos de o producidos en células de mamífero o de insecto están glucosilados. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos obtenidos de o producidos en células procariotas carecen de glucosilación o están aglucosilados. La glucosilación de anticuerpos también puede modificarse o eliminarse por mutación de secuencias de sitios de glucosilación.

Un anticuerpo o fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse de una fuente natural, prepararse sintéticamente o mediante métodos recombinantes. Los métodos de producción de anticuerpos son conocidos para aquellos expertos en la materia e incluyen producir anticuerpo o fragmentos de anticuerpos por expresión en fago. Se conocen métodos de producción a gran escala e incluyen la producción de anticuerpo o fragmentos del mismo en cantidades de 10 litros o mayores.

El anticuerpo o fragmentos de anticuerpos se purifican mediante métodos conocidos para aquellos expertos en la materia. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento producido se purifica para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Pueden emplearse métodos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica. Los siguientes métodos son a modo de ejemplo de métodos de purificación adecuados: fraccionamiento sobre columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75. Por ejemplo, como primera etapa de la purificación, el anticuerpo o fragmento del mismo derivado del cultivo celular se aplica sobre la fase sólida inmovilizada de proteína A para permitir la unión específica del anticuerpo a la proteína A. A continuación, la fase sólida se lava para eliminar contaminantes no específicamente unidos a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo se recupera de la fase sólida por elución.

En algunas realizaciones de la invención, la concentración del anticuerpo en la solución usada en los métodos de la invención es al menos 1 g/l. La concentración del anticuerpo en la solución oscila de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 g/l. En otras realizaciones de la invención, la concentración del anticuerpo oscila de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 g/l. En otra realización más de la invención, la concentración del anticuerpo oscila de aproximadamente 40 a aproximadamente 90 g/l.

Procedimientos

Los métodos de la invención implican métodos de cristalización de bevacizumab en solución. Los cristales o geles de proteína son útiles, por ejemplo, para caracterizar la estructura de, para almacenar, para concentrar, para purificar y para la administración del anticuerpo. En algunas realizaciones, la concentración del anticuerpo que se concentra es al menos 1 g/l, y más preferentemente al menos 40 a 90 g/l. Los métodos de la invención proporcionan un método de bajo coste de producción de cristales de anticuerpo. En un aspecto de la invención, un método comprende poner en contacto el anticuerpo con una solución como se define en las reivindicaciones que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una sal de catión divalente e incubar el anticuerpo con la solución hasta que se forman cristales del anticuerpo.

En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto el anticuerpo con una solución que comprende, que consiste esencialmente en o consiste en cloruro de cinc a una concentración de 1 a 120 mM, más preferentemente 10 a 80 mM, y lo más preferentemente 25 a 60 mM

En algunas realizaciones, la solución comprende, consiste esencialmente en o consiste en ZnCl₂ 1 a 100 mM. En realizaciones específicas, la solución comprende ZnCl₂ superior a 10 mM y NaOAc superior a 5 mM, y preferentemente ZnCl₂ 100 mM y NaOAc 10 mM. En algunas realizaciones, el método proporciona un gel de proteína que comprende cristales.

En algunas realizaciones, como se definen en las reivindicaciones, el método comprende poner en contacto el anticuerpo con una solución que comprende: cloruro de magnesio, a un pH alto, de aproximadamente 9.

5 En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto el anticuerpo con una solución que comprende, que consiste esencialmente en cloruro de cinc, pero carece de otros precipitantes. En algunos casos, puede desearse minimizar el uso de otros precipitantes, tales como moléculas orgánicas que incluyen 2-metil-2,4-pentanodiol, iso-propanol o compuestos poliméricos, que incluyen polietilenglicoles o poliaminas.

10 Estas realizaciones pueden ofrecer una ventaja con respecto a los métodos de cristalización del estado de la técnica debido a que no se usan otros precipitantes. Una ventaja posible en no usar ningún precipitante orgánico o polimérico sería económica, es decir, en una operación a gran escala, por ejemplo, el coste de los precipitantes orgánicos podrían ser significativo, de modo que un método que no los usa sería más económicamente eficiente. Otra ventaja posible en no usar ningún precipitante orgánico sería que no habría ningún residuo del precipitante orgánico en los cristales finales. Esto podría ser una ventaja debido al deseo de usar anticuerpos cristalizados para formular soluciones para administración a mamíferos. Algunos de los precipitantes orgánicos que se usan pueden no ser deseables de administrar a mamíferos, tales como seres humanos.

20 Los métodos de la invención también incluyen una solución que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una sal de un catión divalente y un tampón. Los tampones que pueden usarse en la invención incluyen cualquiera comúnmente usado por aquellos expertos en la materia. Ejemplos de aquellos incluyen, pero no se limitan a, ácido acético, carbonato de amonio, fosfato de amonio, ácido bórico, ácido cítrico, HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico), bicina, MES, cacodilato de sodio, imidazol, cloruro de amonio, formiato de magnesio, ácido láctico, ácido fosfórico, citrato de potasio, metafosfato de potasio, fosfato de potasio monobásico, acetato sódico, citrato de sodio, lactato de sodio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico y Tris (tris-hidroximetilamino-etano). En algunas realizaciones de la invención se usa acetato sódico (NaOAc) como tampón.

30 En algunas realizaciones, la concentración del tampón en la solución puede oscilar de 1 a 100 mM. En otra realización de la invención, la concentración del tampón en la solución puede oscilar de 5 a 100 mM, más preferentemente 1 a 20 mM, y lo más preferentemente 25 a 75 mM.

35 En algunas realizaciones, el tampón se combina con la sal de un catión divalente y el anticuerpo como sólido. En otra realización de la invención, el tampón se combina con la sal del catión divalente y el anticuerpo como solución. En otra realización de la invención, el tampón sólido y la sal divalente sólida pueden ponerse en solución y a continuación combinarse con el anticuerpo, tanto en solución como en una forma sólida.

40 Normalmente, el pH de la solución depende al menos en parte del tampón específico que se usa. En una realización, el pH deseado de la solución depende al menos en parte de la sal del catión divalente y la solubilidad de la sal a diferentes pH. En algunas realizaciones, el pH del tampón puede oscilar de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 9. En realizaciones, si el catión divalente es Zn, el pH de la solución está entre aproximadamente 4 y 6. En otra realización de la invención, si el catión divalente es Zn, la concentración del acetato sódico en la solución es entre 1 y 100 mM, y el pH de la solución es entre aproximadamente 4,7 y 5,7. En otras realizaciones, el catión divalente es Mg, el tampón es Tris y el pH de la solución es aproximadamente 9.

45 En una realización, el pH de la solución, el tampón que se usa y la sal divalente que se usa pueden depender al menos en parte del anticuerpo que va a cristalizarse. En algunas realizaciones de la invención, puede haber una interacción entre estos factores debido a que el anticuerpo puede estar estable dentro de un intervalo de pH específico, que podría imponer, al menos en parte, el tampón que va a usarse, y similarmente puede imponer al menos en parte la sal divalente que va a usarse (debido, por ejemplo, a cuestiones de solubilidad). Un experto en la materia puede determinar qué concentración de tampón y concentración de sal del catión divalente haciendo una curva de solubilidad e identificando los intervalos de concentración o tampón, sal divalente y pH que producen un cambio de fase.

50 En algunas realizaciones, el anticuerpo se cristaliza con sal de cinc al menos 25 mM y tampón al menos 50 mM, tal como acetato sódico. En otras realizaciones es preferible una combinación de 10 a 80 mM de sal de cinc y tampón 25 a 75 mM, tal como acetato sódico.

60 Los métodos de la invención comprenden poner en contacto la solución y el anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo se pone en contacto con la solución en un método de difusión de vapor. En la difusión de vapor, un pequeño volumen (es decir, algunos milímetros) de solución de anticuerpo se mezcla con la solución. Esta mezcla se suspende sobre un pocillo que contiene una pequeña cantidad de solución. En otras realizaciones, el método de poner en contacto implica diálisis. La diálisis implica una membrana de exclusión por tamaño semipermeable que retiene el anticuerpo, pero permite que moléculas pequeñas tales como tampones y precipitantes difundan hacia adentro y hacia afuera. El precipitante difunde lentamente a través de la membrana y reduce la solubilidad del anticuerpo. Otra realización es un método tipo discontinuo. En el método discontinuo, la solución se añade a la solución del anticuerpo.

65

Los métodos de la invención comprenden incubar el anticuerpo o fragmento del mismo con la solución hasta que se forman cristales o un gel de proteína. En algunas realizaciones, la solución puede mezclarse suavemente una vez o dos veces por día durante la incubación. En otras realizaciones, la solución puede mezclarse continuamente. Si se desean cristales grandes debe minimizarse la mezcla.

5 La incubación puede realizarse durante un intervalo de temperaturas de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 27 °C, más preferentemente aproximadamente 2 a 25 °C. En algunas realizaciones, la temperatura se mantiene a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 25 °C). En otros casos, la incubación se realiza a de aproximadamente 2 a 8 °C.

10 Una solución y anticuerpo, o fragmento del mismo, se incuban hasta que se forman cristales o gel de proteína. Normalmente, el tiempo de incubación es de aproximadamente 1 hora a 30 días, más preferentemente 1 a 5 días.

15 Pueden formarse cristales como sólidos libres o en un gel. En algunas realizaciones de la invención, los cristales de anticuerpos o fragmentos de los mismos son parte de un gel. Generalmente, los geles formados en métodos de la invención tienen una alta concentración de anticuerpo o fragmentos de anticuerpos. En una realización, un gel que se forma usando un método de la invención tiene una concentración de aproximadamente 200 a aproximadamente 250 mg de anticuerpo/ml.

20 **Composiciones o formulaciones**

Los métodos de la invención implican la formación de cristales de anticuerpos, o fragmentos de los mismos. Los cristales tienen una estructura tridimensional regular, normalmente denominada una red cristalina. Esto es a diferencia de un sólido amorfo, que es un sólido no cristalino que no tiene red cristalina molecular regular y tiene una estructura heterogénea o no molecular. Un gel es una solución de proteína concentrada que puede ser blanda y viscosa o dura y frágil.

Los cristales formados en los métodos descritos en el presente documento pueden tener varias formas que incluyen agujas, formas similares a cono; esféricas y similares a flor. El tamaño de los cristales puede estar en el orden de mm a μm de tamaño. En algunas realizaciones, los cristales tienen al menos aproximadamente 10 μm de tamaño, de manera que son 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 superior a para administración intravenosa.

35 En algunos casos, puede desearse verificar que los cristales son cristales de anticuerpo, o fragmento de los mismos. Los cristales de fragmentos de anticuerpos de los mismos pueden analizarse microscópicamente bajo luz birrefringente. Los cristales permitirán que la luz birrefringente pase a su través, mientras que no el material no cristalino. En otro método más, los cristales pueden aislarse, lavarse, resolubilizarse y migrarse en gel de SDS-PAGE y, opcionalmente, teñirse con un anticuerpo anti-receptor de Fc. Opcionalmente, el anticuerpo resolubilizado, o fragmento del mismo, también puede probarse para unirse a su antígeno específico utilizando ensayos estándar. El anticuerpo resolubilizado o fragmento del mismo también puede analizarse por espectrometría de masas.

45 En algunos casos, los cristales pueden reticularse entre sí. Tal reticulación puede potenciar la estabilidad del cristal. Los métodos para reticular cristales son conocidos para aquellos expertos en la materia y se han descrito, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nº 5.849.296. Los cristales pueden reticularse usando un reactivo bifuncional tal como glutaraldehído. Una vez reticulados, los cristales pueden liofilizarse y guardarse para su uso, por ejemplo, en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas.

50 En algunos casos, puede desearse secar los cristales. Los cristales pueden secarse con N_2 , y/o gases inertes, secado en estufa de vacío, liofilización, evaporación, secado en bandeja, secado en lecho fluidizado, secado por pulverización, secado a vacío o secado en rodillos.

Los cristales pueden mantenerse en la solución, o pueden lavarse y combinarse con otros vehículos y/o componentes para formar composiciones y/o formulaciones de los cristales. Las composiciones y formulaciones pueden usarse, por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

55 Otro aspecto de la divulgación implica composiciones y/o la formulación de cristales o geles de proteína del anticuerpo o fragmento del mismo. Una composición comprende un cristal o gel de proteína de un anticuerpo, o fragmento del mismo, y un vehículo. Una formulación comprende un cristal o gel de proteína de un anticuerpo, o fragmento del mismo, y al menos un componente. En algunas realizaciones, el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en anti-VEGF, anti-Apo-2, anti-CD20, anti-CD11a, anti-HER2, anti-IgE, y fragmentos de los mismos.

65 Las formulaciones o composiciones del cristal del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se preparan para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed.

(1980)), en forma de soluciones acuosas, formulaciones liofilizadas u otras secadas. Vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; 5 cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; 10 azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

En algunas realizaciones, los cristales pueden combinarse con un vehículo polimérico para proporcionar estabilidad y liberación sostenida. Tales polímeros incluyen polímeros biocompatibles y biodegradables. Un vehículo polimérico 15 puede ser un único tipo de polímero o puede estar compuesto de una mezcla de tipos de polímeros. Ejemplos no limitantes de vehículos poliméricos incluyen, por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres) tales como poli(ácido láctico) o PLA, poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(β-hidroxi butirato), poli(caprolactona) y poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli(hidroxi propil)metacrilamida, poli[(organo)fosfaceno], poli(ortoésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido 20 maleico-éter alquilvinílico, polioles plurónicos, albúmina, polipéptidos naturales y sintéticos, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glucaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, almidones modificados tales como almidón de amilosa, almidón de amilopectina, hidroxietilalmidón, almidón de metacrilato, y otros almidones, y cualquier material convencional que encapsule cristales de proteína.

Formulaciones de cristales de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, incluyen al menos un componente o 25 excipiente. El componente o excipientes son conocidos para aquellos expertos en la materia e incluyen agentes acidificantes, propulsores de aerosol, desnaturalizantes de alcoholes, agentes alcalinizantes, agentes antiapelmazantes, agentes antiespumantes, conservantes microbianos, antioxidantes, agentes de tamponamiento, lubricantes, colores, desecantes, agentes emulsionantes, adyuvantes de filtrado, aromas y perfumes, humectantes, 30 pomadas, plastificantes, disolventes (por ejemplo, aceites u orgánicos), sorbentes, sorbentes de dióxido de carbono, agentes de rigidización, bases para supositorios, agentes de suspensión o que aumentan la viscosidad, edulcorantes, aglutinantes de comprimidos, diluyentes para comprimidos o cápsulas, disgregantes para comprimidos, lubricantes para comprimidos o cápsulas, agente de tonicidad, vehículos aromatizados o edulcorados, vehículos oleaginosos, vehículos de soporte sólidos, agente repelente del agua y agentes humectantes o 35 solubilizantes.

En algunas realizaciones, el componente potencia la estabilidad durante el almacenamiento. En otras realizaciones, el componente o excipiente está seleccionado preferentemente del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, 40 trehalosa, lactitol, gelatina e hidroxipropil-β-ciclodextrina.

Las composiciones y formulaciones descritas en el presente documento también comprenden una cantidad eficaz de anticuerpo cristalino o fragmento del mismo. Las dosificaciones pueden determinarse fácilmente usando 45 metodología estándar. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg (por 50 ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, como por infusión continua. Una dosificación diaria o semanal típica podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 20 mg/kg o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación.

En algunos casos, las composiciones o formulaciones comprenden una concentración de anticuerpo, o fragmento 55 del mismo, de al menos aproximadamente 1 g/l o mayor cuando se resolubiliza. En otras realizaciones, la concentración de anticuerpo es al menos aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 100 g/l cuando se resolubiliza.

Los cristales y/o geles de proteína de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, o formulaciones o 60 composiciones que comprenden tales cristales o geles de proteína, pueden administrarse solos, como parte de una preparación farmacéutica, de cuidado personal o veterinaria, o como parte de una preparación profiláctica, con o sin adyuvante. Pueden administrarse por vías parenteral, oral o tópica. Por ejemplo, pueden administrarse por vías oral, pulmonar, nasal, aural, anal, dérmica, ocular, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, mucosa, sublingual, subcutánea, transdérmica, tópica o intracraneal, o en la cavidad bucal. En cualquiera de las aplicaciones 65 farmacéuticas, de cuidado personal o veterinarias, los cristales de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, o formulaciones cristalinas o composiciones de las mismas pueden administrarse tópicamente a cualquier superficie epitelial. Tales superficies epiteliales incluyen superficies orales, oculares, aurales, anales y nasales, que pueden tratarse, protegerse, repararse o desintoxicarse por la aplicación de cristales de un anticuerpo o fragmento del

mismo, o formulaciones cristalinas o composiciones de las mismas.

Otro aspecto de la divulgación incluye artículos de fabricación. Los artículos de fabricación comprenden una composición o formulación que comprende un cristal o gel de proteína de anticuerpo o fragmento del mismo y un recipiente. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos son preferentemente anti-VEGF, anti-CD20, anti-Apo-2, anti-CD11a, anti-HER2, anti-IgE, o fragmentos de los mismos. Opcionalmente, el artículo de fabricación puede incluir instrucciones para administración a un ser humano para uso terapéutico.

Los artículos de fabricación también pueden comprender una composición o formulación de un cristal o gel de proteína de un anticuerpo, o fragmentos del mismo, y varios reactivos de diagnóstico para detectar el anticuerpo de unión, o fragmento del mismo, a su antígeno específico. Agentes para detectar la unión del anticuerpo a su antígeno específico incluyen anticuerpos para el anticuerpo que se marcan con un agente detectable. El agente detectable puede incluir un resto fluorescente, resto radiactivo y un resto enzimático. En algunas realizaciones, un artículo de fabricación comprende una composición o una formulación de un cristal o gel de proteína de un anticuerpo y un recipiente. El artículo de fabricación puede comprender además instrucciones para administrar la composición o formulación a un ser humano.

Usos de composiciones o formulaciones

Las composiciones o formulaciones de la divulgación que comprenden cristales o gel de proteína de anticuerpo, o fragmentos del mismo, puede usarse para cualquier fin para el que se usan preparaciones de anticuerpos convencionales. Por ejemplo, pueden utilizarse composiciones o formulaciones, por ejemplo, para la purificación, concentración, obtención de imágenes, aplicaciones de diagnóstico y/o terapéuticas. En algunas realizaciones, pueden usarse geles de proteína o cristales que están presentes en geles para administración tópica, como solución a partir de la cual tiene lugar adicionalmente la cristalización o purificación, o como una solución para almacenamiento de los cristales.

En algunas realizaciones, las composiciones o formulaciones comprenden un cristal de, unidad cristalina, o gel de proteína de anticuerpo anti-VEGF. Estas composiciones o formulaciones son útiles en métodos de diagnóstico y métodos de tratamiento de trastornos o afecciones asociados a VEGF. Se han descrito trastornos o afecciones asociados a VEGF y ensayos de diagnóstico, por ejemplo, en el documento WO 98/45331. Los anticuerpos anti-VEGF son útiles en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos neoplásicos y no neoplásicos. Las neoplasias y afecciones relacionadas que son susceptibles a tratamiento incluyen carcinomas de mama, carcinomas de pulmón, carcinomas gástricos, carcinomas esofágicos, carcinomas colorrectales, carcinomas hepáticos, carcinomas de ovario, tecomas, arrenoblastomas, carcinomas cervicales, carcinoma endometriales, hiperplasia endometrial, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, carcinoma de cabeza y cuello, nasofaríngeo, carcinomas laríngeos, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de la piel, hemangioma, hemangioma cavernoso, hemangioblastoma, carcinomas del páncreas, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, schwannoma, oligodendroglioma, meduloblastoma, neuroblastomas, rhabdomyosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomiomas, carcinomas de las vías urinarias, carcinoma tiroideos, tumor de Wilm, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, proliferación vascular anormal asociada a facomatosis, edema (tal como el asociado a tumores cerebrales) y síndrome de Meigs.

Las afecciones neoplásicas que son susceptibles a tratamiento incluyen artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y otras proliferativas, que incluyen retinopatía del prematuro, fibroplasias retrolentales, glaucoma neovascular, degeneración macular senil, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de Graves), trasplante de córnea y de otros tejidos, inflamación crónica, inflamación de pulmón, síndrome nefrítico, preeclampsia, ascitis, efusión pericárdica (tal como la asociada a pericarditis) y efusión pleural.

La degeneración macular senil (DMS) es una causa frecuente de pérdida visual grave en la población anciana. La forma exudativa de la DMS se caracteriza por neovascularización coroidea y desprendimiento de células epiteliales del pigmento retiniano. Debido a que la neovascularización coroidea está asociada a un espectacular empeoramiento en el pronóstico, se espera que los anticuerpos para VEGF de la presente invención sean especialmente útiles en reducir la gravedad de la DMS.

En algunas realizaciones, las composiciones o formulaciones de la divulgación comprenden un cristal, unidad cristalina o gel de proteína de anti-CD11a. Estas composiciones o formulaciones son útiles en métodos de diagnóstico y métodos de tratamiento de trastornos o afecciones asociados a CD11a. Se describen trastornos o afecciones asociados a CD11a y ensayos de diagnóstico en la patente de EE.UU. N° 6.037.454.

El anticuerpo anti-CD11a (la subunidad α de LFA-1) puede usarse para el tratamiento de diversos trastornos mediados por LFA-1. El antígeno 1 asociado a la función de linfocito (LFA-1; CD11a/CD18) participa en la adhesión de leucocitos durante interacciones celulares esenciales para respuestas inmunológicas e inflamación. El término "trastorno mediado por LFA-1" se refiere a un estado patológico producido por la interacción de la adherencia de las células que implican el receptor de LFA-1 sobre linfocitos. Ejemplos de tales trastornos incluyen respuestas inflamatorias de linfocitos T tales como enfermedades inflamatorias de la piel que incluyen psoriasis; respuestas

asociadas a enfermedad inflamatoria del intestino (tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); síndrome disneico del adulto; dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis; afecciones alérgicas tales como eccema y asma; afecciones que implican infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas; reacciones de hipersensibilidad de la piel (que incluyen hiedra venenosa y roble venenoso); aterosclerosis; deficiencia de la adhesión de leucocitos; enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes mellitus, esclerosis múltiple, síndrome de Raynaud, tiroiditis autoinmune, encefalomiелitis autoinmune experimental, síndrome de Sjögren, diabetes juvenil y respuestas inmunitarias asociadas a hipersensibilidad retardada mediada por citocinas y linfocitos T normalmente encontrados en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); bronquitis; insulinitis; rinitis; urticaria; glomerulonefritis; enfermedades que implican diapédesis de leucocitos; trastorno inflamatorio del SNC; síndrome de lesión multiorgánica secundaria a septicemia o traumatismo; anemia hemolítica autoinmune; miastenia grave; enfermedades mediadas por el complejo de antígeno-anticuerpo; síndrome nefrótico; tumores malignos (por ejemplo, tumores malignos de linfocitos B tales como leucemia linfocítica crónica o leucemia de células pilosas); todos los tipos de trasplantes, que incluyen enfermedad de injerto frente al huésped o huésped frente al injerto; infección por el VIH y rinovirus; fibrosis pulmonar; invasión de células tumorales en órganos secundarios, etc.

En algunas realizaciones, las composiciones o formulaciones de la divulgación comprenden un cristal, unidad cristalina o gel de proteína de anti-HER2. Estas composiciones o formulaciones son útiles en métodos de diagnóstico y métodos de tratamiento de trastornos o afecciones asociados a HER2. Se describen trastornos o afecciones asociados a HER2 y ensayos de diagnóstico en la patente de EE.UU. N° 6.387.371.

La administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos anti-receptor HER2 inhibe el crecimiento de células tumorales, inhibiendo la función del receptor HER2. Trastuzumab (Genentech, Inc.) es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante dirigido al dominio extracelular de HER2 para el tratamiento de cáncer expresado en exceso por HER2/amplificado por el gen HER2, particularmente cáncer de mama metastásico (CMM). El gen HER2 también puede amplificarse en adenocarcinoma de las glándulas salivales, adenocarcinoma renal, carcinoma de las glándulas mamarias y línea de células de cáncer gástrico. El anticuerpo también puede administrarse a pacientes en combinación con otros terapéuticos, por ejemplo, paclitaxel o Tarceva®.

En algunas realizaciones, las composiciones o formulaciones de la divulgación comprenden un cristal, unidad cristalina o gel de proteína de anti-CD20. Estas composiciones o formulaciones son útiles en métodos de diagnóstico y métodos de tratamiento de trastornos o afecciones asociados a CD20. Se describen trastornos o afecciones asociados a CD20 y ensayos de diagnóstico en las patentes de EE.UU. N° 6.171.586 y 5.736.137.

CD20 (también conocido como Bp35) es un antígeno de interés para elegir como diana la enfermedad que se refiere a neoplasias de linfocitos B debido a su expresión a niveles muy altos. CD20 es un marcador de linfocitos B humanos que se expresa durante el desarrollo temprano de pre-linfocitos B y sigue hasta la diferenciación de células plasmáticas. La molécula CD20 puede regular una etapa en el proceso de activación que se requiere para la iniciación y diferenciación del ciclo celular. Así, el antígeno de superficie CD20 puede ser elegido como diana para el tratamiento de linfoma de linfocitos B.

C2B8 es un anticuerpo quimérico anti-CD20 inmunológicamente activo específico. La intervención terapéutica con el anticuerpo C2B8 purga o empobrece de linfocitos B la sangre periférica y tejido linfático como un medio de eliminación de linfomas de linfocitos B, ya que los sistemas de mamífero recuperan fácilmente y eficazmente los linfocitos B de la sangre periférica. Cuando el sistema inmunitario tiene una deficiencia de linfocitos B de la sangre periférica, no es necesaria la necesidad de precauciones "extraordinarias" (es decir, aislamiento del paciente, etc.), ya que la principal respuesta inmunitaria de los primates está mediada por linfocitos T. C2B8 también puede marcarse con marcas radiactivas para destruir células tumorales diana.

En algunas realizaciones, las composiciones o formulaciones de la divulgación comprenden un cristal, unidad cristalina o gel de proteína de anticuerpo anti-Apo-2. Estas composiciones o formulaciones son útiles en el tratamiento de trastornos tales como cáncer. Los usos terapéuticos para un anticuerpo anti-Apo-2 se describen en la patente de EE.UU. N° 6.252.050. Por consiguiente, la divulgación proporciona métodos de tratamiento del cáncer usando anticuerpos, tales como anticuerpos para el receptor Apo-2L reactivo de forma cruzada. Pueden emplearse anticuerpos Apo-2 agonistas, por ejemplo, para activar o estimular la apoptosis en células cancerosas. Se contempla, por supuesto, que los métodos de la invención puedan emplearse en combinación con todavía otras técnicas terapéuticas tales como cirugía.

En algunas realizaciones, las composiciones o formulaciones de la divulgación comprenden un cristal, unidad cristalina o gel de proteína de un anticuerpo anti-IgE (estas composiciones o formulaciones son útiles en el tratamiento de trastornos mediados por IgE, por ejemplo, trastornos alérgicos e inflamación). Los usos terapéuticos para un anticuerpo anti-IgE se describen en las patentes de EE.UU. N° 6.329.509 y 5.994.511.

Pueden usarse anticuerpos y anticuerpos marcados en varios métodos de inmunoimagenología o de inmunoensayo para detectar la presencia de cáncer en un paciente o monitorizar el estado de tal cáncer en un paciente ya

diagnosticado que lo tiene. Cuando se usa para monitorizar el estado de un cáncer, debe usarse un método de inmunoensayo cuantitativo. Si tales ensayos de monitorización se llevan a cabo periódicamente y se comparan los resultados, puede hacerse una determinación referente a si la carga tumoral del paciente ha aumentado o disminuido. Técnicas de ensayo comunes que pueden usarse incluyen ensayos directos e indirectos. Si la muestra incluye células cancerosas, el anticuerpo marcado se unirá a aquellas células. Después de lavar el tejido o células para eliminar el anticuerpo marcado no unido, la muestra de tejido se lee para la presencia de inmunocomplejos marcados. En los ensayos indirectos, la muestra de tejido o de células se incuba con anticuerpo monoclonal no marcado. Entonces, la muestra se trata con un anticuerpo marcado contra el anticuerpo monoclonal (por ejemplo, un anticuerpo anti-murino marcado), se lava y se lee para la presencia de complejos ternarios.

Aunque lo anterior se refiere a realizaciones particulares, se entenderá que la presente invención no se limita a éstas. Se les ocurrirá a aquellos expertos habituales en la materia que pueden hacerse diversas modificaciones a las realizaciones desveladas sin cambiar el concepto global de la invención. Todas aquellas modificaciones pretenden estar dentro del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Solubilidad del anticuerpo anti-VEGF en diversas concentraciones de cloruro de cinc y acetato sódico

La cristalización de anticuerpos de longitud completa y/o glucosilados puede ser difícil. El tamaño, forma y presencia de restos de azúcar contribuyen a la dificultad de obtener cristales de anticuerpo. Pueden necesitar investigarse muchas combinaciones diferentes de precipitantes orgánicos y no orgánicos, tampones y cosolutos para encontrar las condiciones adecuadas para la cristalización de anticuerpos. Se investigó la solubilidad de un anticuerpo glucosilado de longitud completa de VEGF en soluciones de concentraciones variables de $ZnCl_2$ y NaOAc para determinar si podrían formarse cristales de proteína de anticuerpo con estas condiciones.

Materiales y métodos

Preparación y purificación de anticuerpo anti-VEGF

El anticuerpo anti-VEGF (bevacizumab) puede prepararse generalmente como se describe en el documento WO 98/45331 y Presta y col., Can. Res., 57:4593-4599,

El método también se describe generalmente más adelante. Se clonó y se secuenció un anticuerpo murino específico para VEGF, designado A4.6.1 (Kunkel y col., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488-492). Se usó una secuencia consenso sintética para dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas humanas para generar un modelo gráfico por ordenador en el que las CDR murinas podrían importarse usando el programa Insight™ (Accelrys, Inc. San Diego CA). También se generaron modelos informáticos de las regiones V_H y V_L del anticuerpo murino A4.5.1 para determinar la confirmación de las CDR.

Se construyeron plásmidos que codifican todas las variantes humanizadas de F(ab) de A4.6.1 a partir del molde de plásmido para F(ab)-1. El plásmido pEMX1 (Kunkel y col., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488-492) contiene un fragmento de ADN que codifica el subgrupo I de V_LP humano consenso y el subgrupo III de V_H . Se construyó el anti-VEGF humanizado por mutagénesis dirigida al sitio de pEMX1 (Kunkel y col., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488-492). Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-VEGF se proporcionan en el documento WO 98/45331.

Un ejemplo de un método de producción de anti-VEGF se describe en el presente documento. Para la expresión de la variante de IgG1 humanizada estable (rhuMab VEGF), se transfectaron células de ovario de hámster chino (CHO) con vectores dicistrónicos diseñados para coexpresar tanto las cadenas pesadas como ligeras (Lucas y col., 1996 Nucleic Acids Res., 24:1774-1779). Se introdujeron plásmidos en células DP12, un derivado patentado de la línea celular CHO-K1 DUX B11 desarrollada por L. Chasin (Universidad de Columbia, Nueva York, NY), mediante lipofectina, y se seleccionaron para el crecimiento en medio libre de glicina/hipoxantina/timidina (GHT) (Chisolm y col., 1996 DNA Cloning 4. Mammalian systems, pág. 1-41, Oxford: Oxford University Press).

Se eligieron aleatoriamente veinte clones no amplificados y se volvieron a sembrar en placas de 96 pocillos. Se monitorizó la productividad específica relativa de cada colonia usando ELISA para cuantificar la IgG humana de longitud completa acumulada en cada pocillo después de tres días. Se usó un colorante fluorescente, calceína AM, como marcador sustituto del número de células viables por pocillo. Basándose en estos datos, se eligieron varios clones no amplificados para la amplificación adicional en presencia de concentraciones crecientes de metotrexato. Se eligieron los clones individuales que sobrevivieron a metotrexato 10, 50 y 100 nM y se transfirieron a placas de 96 pocillos para el cribado de la selectividad.

Un clon, que presentó reproduciblemente alta productividad específica, se expandió en matraces T y se usó para inoculación de un cultivo con agitación centrifuga. Después de varios pases, las células adaptadas a la suspensión se usaron para inocular cultivos de producción en medio libre de suero que contiene GHT complementado con

diversas hormonas e hidrolizados de proteína. El fluido de cultivo celular recogido que contiene el rhuMab (anticuerpo monoclonal humanizado recombinante) VEGF se purificó usando proteína A-Sepharose® CL-4B. La pureza después de esta etapa fue ~99 %. La posterior purificación a homogeneidad se llevó a cabo usando una etapa de cromatografía de intercambio iónico que utiliza Q Sepharose® seguido de CM Sepharose®. El contenido de endotoxina del anticuerpo purificado final fue <0,10 ue/mg. El anticuerpo purificado se concentró y se purificó adicionalmente usando ultrafiltración y diafiltración. Procedimientos alternativos para la purificación y/o concentración incluyen filtración de flujo tangencial.

Condiciones de cristalización

Se dializó anti-VEGF preparado como se ha descrito anteriormente en agua Milli-Q® y se concentró a 84,4 g/l. El pH de una solución madre de NaOAc 1 M se ajustó a pH 5,7 con HCl 6 N. Los tampones se prepararon siguiendo un esquema de dilución sucesiva y el pH se ajustó a pH 5,7 con NaOH 1 N. Las concentraciones de ZnCl₂ oscilaron de 5 a 100 mM y la concentración de NaOAc varió de 10 a 100 mM.

El método de diálisis de cristalización utilizó una membrana de exclusión por tamaño semi-permeable que retiene proteína, pero permite que moléculas pequeñas (es decir, tampones y precipitantes) difundan libremente a través de la membrana. El método de diálisis incluyó usar un (1) ml de la solución madre de anti-VEGF inyectada en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer® (Pierce, Rockford, IL) y se dializó en cada solución madre durante la noche a 5 °C. Los tampones de diálisis se intercambiaron un total de tres veces durante un periodo de tres días. Los dispositivos de diálisis se mezclaron continuamente en cada solución madre y el material resultante se recuperó después de tres días. El material se recuperó rebanando cuidadosamente la membrana del casete de diálisis y transfiriendo la solución del gel a un tubo usando una espátula estéril. Se generaron curvas de solubilidad midiendo la concentración de proteína del material recuperado del casete de diálisis. La concentración de proteína se representó contra la concentración de ZnCl₂.

Resultados

La curva de solubilidad de anti-VEGF en ZnCl₂ y NaOAc, pH 5,7, se muestra en la Figura 1.

A medida que aumenta la concentración de ZnCl₂, se observa una disminución en la solubilidad de anti-VEGF. Durante la diálisis de anti-VEGF en concentraciones variables de ZnCl₂ en un tampón NaOAc, se observó la formación de geles en los casetes de diálisis. El gel empezó inicialmente turbio. El gel con cristales se formó en el plazo de 25 minutos desde la diálisis en tampones que contienen tan solo ZnCl₂ 2 mM a temperatura ambiente y a 4 °C. Los geles se analizaron adicionalmente por microscopía y se observó material cristalino en los geles. Los cristales dentro del gel fueron muy pequeños y uniformes. Cuando se observaron bajo un microscopio, los cristales dentro del gel mostraron birrefringencia cuando se visualizaron bajo polarizadores cruzados, indicando que era materia cristalina.

Se investigaron previamente muchas condiciones que incluyen precipitantes orgánicos e inorgánicos con varios tampones y cosolutos para la capacidad para cristalizar un anticuerpo glucosilado de longitud completa. Muchas de las condiciones investigadas no produjeron la formación de cristales del anticuerpo (datos no mostrados). Fue deseable diseñar un método de cristalización que evitara el uso de precipitantes orgánicos, especialmente para anticuerpos que van a usarse terapéuticamente.

Los estudios de los presente inventores indicaron que una combinación de un catión divalente tal como en forma de una sal tal como ZnCl₂ en un tampón NaOAc podría utilizarse para formar cristales de anticuerpos de longitud completa sin ningún precipitante orgánico. La solubilidad del anticuerpo anti-VEGF en concentraciones variables de ZnCl₂ en un tampón NaOAc permite una determinación de la concentración de ZnCl₂ en NaOAc en el que anti-VEGF se vuelve insoluble produciendo la formación de cristales. A bajas concentraciones de ZnCl₂ se observan cristales libres. El aumento de las concentraciones de ZnCl₂ produce la formación de un gel que contiene cristales. Los resultados del estudio de solubilidad determinaron el intervalo de concentración usado para el estudio de cristalización discontinua en el siguiente ejemplo.

Ejemplo 2

Cristalización de anti-VEGF con cloruro de cinc y acetato sódico

Como se describe en el Ejemplo 1, soluciones de anti-VEGF dializadas con soluciones de concentraciones variables de ZnCl₂ y NaOAc se volvieron insolubles a ciertas concentraciones y produjeron la formación de cristales y/o geles. Se estudió la cristalización de anti-VEGF con soluciones de ZnCl₂ y NaOAc sin precipitantes orgánicos bajo tanto condiciones de diálisis como condiciones discontinuas. Los cristales obtenidos se caracterizaron adicionalmente. Se desea cristalización bajo condiciones discontinuas debido a que estas condiciones pueden escalarse hasta la producción a gran escala.

Material y métodosProcedimientos y análisis de cristalización

- 5 Se preparó anti-VEGF concentrando anti-VEGF a partir de 36 g/l a 84,4 g/l por ultrafiltración centrífuga y se dializó en agua Milli-Q®. La concentración resultante de anti-VEGF fue 84,4 g/l y se incubó con concentraciones variables de ZnCl₂ y NaOAc tanto por diálisis como discontinuamente. La concentración de anti-VEGF se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm.
- 10 También se prepararon cuatro soluciones madre de cristalización de ZnCl₂ y NaOAc del siguiente modo:
- 1: ZnCl₂ 10 mM, NaOAc 100 mM, pH 5,7
 2: ZnCl₂ 50 mM, NaOAc 100 mM, pH 5,7
 3: ZnCl₂ 50 mM, NaOAc 10 mM, pH 5,7
 15 4: ZnCl₂ 50 mM, el pH se ajustó a 5,7 con hidróxido sódico

Las combinaciones de concentración de ZnCl₂ y NaOAc se muestran en la Tabla 1a.

- 20 Se llevó a cabo el método de diálisis usando un (1) ml de la solución madre de anti-VEGF colocada en un dispositivo de diálisis Slide-A-Lyzer® (Pierce, Rockford, IL) y se dializó en cada solución madre. Los dispositivos de diálisis se mezclaron continuamente en cada solución madre y el material resultante se raspó del dispositivo y se puso en un tubo Eppendorf después de cinco días.

- 25 El experimento también se llevó a cabo usando un método "discontinuo". El método discontinuo empezó añadiendo 0,75 ml de la solución madre de anti-VEGF en una relación 1:1 (es decir, 0,75 ml) con cada una de las soluciones madre de cristalización en tubos Eppendorf. Cada tubo se inclinó durante dos veces al día para proporcionar mezcla suave. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente y se inclinaron dos veces durante cinco días.

Tabla 1a

Condición N°	ZnCl ₂ (mM)	NaOAc pH 5,7 (mM)	Procedimiento	anti-VEGF (g/l)	escala (ml)
1	10	100	diálisis	84,4	1
2	50	100	diálisis	84,4	1
3	50	10	diálisis	84,4	1
4	50	0	diálisis	84,4	1
5	5	50	discontinuo	42,2	1,5
6	25	50	discontinuo	42,2	1,5
7	25	5	discontinuo	42,2	1,5
8	25	0	discontinuo	42,2	1,5

- 30 **Análisis microscópico de cristales**

- Después de recuperarse el material, los cristales se analizaron microscópicamente para morfología en presencia o ausencia de luz birrefringente. El uso de luz birrefringente distingue entre sólidos cristalinos y sólido precipitado. El análisis se llevó a cabo pasando luz entre dos filtros polarizantes. Un filtro se colocó debajo de la muestra y el otro filtro se colocó encima de la muestra. Si la muestra no es cristalina, los dos filtros polarizantes bloquearán el que la luz llegue al observador. Si la muestra es cristalina, inclinará la luz, permitiendo que pase a través del segundo filtro y dentro del ojo del observador. Los cristales se analizaron microscópicamente colocando una muestra sobre un portaobjetos y visualizando los cristales a diversos aumentos.

- 40 Se usaron otros métodos para probar el material sólido que incluyen tinción con colorante IZIT y prueba de aplastamiento / agrietamiento. La prueba de aplastamiento / agrietamiento fue inconclusa debido a que la mayoría del material cristalino era demasiado pequeño para permitir una determinación del aplastamiento frente al agrietamiento. Los resultados del colorante IZIT tampoco fueron coherentes, ya que se observaron muchos negativos falsos y positivos falsos.

Resultados

- 50 Los resultados se muestran en las Tablas 1b y 1c.

La Tabla 1b muestra las observaciones visuales hechas en el día 1, 2 y 5 de las muestras bajo las diversas condiciones, como se facilita en la Tabla 1a.

Tabla 1b

Condición N°	Día 1	Día 2	Día 5
1	opalescente	opalescente	sólidos en trozos
2	líquido blanco	líquido blanco	sólidos en trozos/gel
3	líquido blanco	líquido blanco	gel
4	opalescente, sólidos blancos	opalescente, sólidos blancos	opalescente, sólidos blancos
5	algún sólido blanco	claro	claro
6	lleno de sólidos blancos	gel sobre el fondo	gel
7	sólido claro	claro	claro
8	sólido blanco	gel sobre el fondo	gel sobre el fondo

5 La Tabla 1c muestra las mediciones analíticas que se llevaron a cabo sobre el material recuperado de las muestras bajo las diversas condiciones como se facilita en la Tabla 1a. Los sólidos formados mostraron birrefringencia cuando se visualizaron bajo polarizadores cruzados, pero en la mayoría de los casos fueron demasiado pequeños para que se reconociera una forma regular, o morfología.

Tabla 1c

Condición N°	Birrefringente	Morfología del cristal
1	Sí	No
2	Sí	No
3	Sí	No
4	No	No
5	Sí	Conos poco frecuentes
6	Sí	Flores
7	Sí	Lotes de conos
8	No	No

10 Estos resultados muestran que el anti-VEGF se cristalizó usando combinaciones de $ZnCl_2$ y NaOAc en tanto métodos de diálisis como discontinuos. Cada condición estudiada hizo que anti-VEGF cambiara su fase inmediatamente después de ponerse en contacto con la solución precipitante. Se observaron sólidos que mostraron birrefringencia en cada condición que contenía $ZnCl_2$ y NaOAc, que indica que se formaron cristales en cada una de estas condiciones. En algunos casos, los cristales que se observaron estuvieron dentro de una fase similar a gel de anti-VEGF. En algunos casos, los cristales no pudieron aislarse del gel, de manera que no pudo mostrarse definitivamente que fueran cristales de anti-VEGF. Los cristales forman estructuras similares a cono o tipo flor. Este ejemplo mostró que los cristales de anti-VEGF pueden producirse por tanto métodos de diálisis como discontinuos usando $ZnCl_2$ y NaOAc sin el uso de precipitantes orgánicos.

20 Se muestran imágenes representativas bajo luz birrefringente y no birrefringente en las Figuras 2a-2f. La Figura 2a es una imagen a 200x aumentos de cristales de anti-VEGF formados en presencia de $ZnCl_2$ 5 mM y NaOAc 100 mM, pH 5,7, bajo luz no birrefringente. La Figura 2b es una imagen a 200x aumentos de cristales de anti-VEGF formados en presencia de $ZnCl_2$ 5 mM y NaOAc 100 mM, pH 5,7, bajo luz birrefringente. La Figura 2c es una imagen a 200x aumentos de cristales de anti-VEGF formados en presencia de $ZnCl_2$ 25 mM y NaOAc 10 mM, pH 5,7, bajo luz no birrefringente. La Figura 2d es una imagen a 200x aumentos de cristales de anti-VEGF formados en presencia de $ZnCl_2$ 25 mM y NaOAc 10 mM, pH 5,7, bajo luz birrefringente. La Figura 2e es una imagen a 200x aumentos de cristales de anti-VEGF formados en una solución de $ZnCl_2$ 10 mM, NaOAc 100 mM, pH 5,7, bajo luz no birrefringente. La Figura 2f es una imagen a 200x aumentos de cristales de anti-VEGF formados en una solución de $ZnCl_2$ 10 mM, NaOAc 100 mM, pH 5,7, bajo luz birrefringente.

30 Ejemplo 3

Condiciones de cristalización variables

35 Como se ha descrito previamente, el anticuerpo anti-VEGF se cristalizó en varias concentraciones de $ZnCl_2$ y NaOAc. Otras condiciones de cristalización pueden afectar la capacidad para cristalizar el anti-VEGF o el rendimiento de cristales de anti-VEGF. Se examinó el efecto de cambiar el pH, temperatura y la identidad del catión divalente sobre la cristalización de anti-VEGF.

40

Material y métodos

Se preparó la solución madre de anti-VEGF a 87 g/l en agua Milli-Q® por ultrafiltración y diafiltración sobre una membrana de celulosa regenerada de 10 kD. Cada muestra estuvo comprendida por una relación 1:1 de proteína con respecto a solución de tampón, produciendo una concentración de anti-VEGF final de 43,5 g/l. Se prepararon soluciones madre de ZnCl₂ 1 M, cloruro de calcio (CaCl₂), MgCl₂, disolviendo la cantidad apropiada de sólidos en agua Milli-Q y filtrando las soluciones con un filtro de calidad esterilizante. Se prepararon soluciones madre 1 molar de NaOAc, pH 4,7, y NaOAc, pH 5,7 añadiendo la cantidad apropiada de acetato sódico trihidratado y ácido acético glacial a agua Milli-Q® y se filtraron a través de un filtro de calidad esterilizante.

Se prepararon condiciones de solución añadiendo la cantidad apropiada de agua, solución madre de ión divalente, solución madre de tampón y solución madre de proteína. La solución madre de proteína siempre se añadió la última.

Se examinaron combinaciones de concentraciones de ZnCl₂, MgCl₂, CaCl₂ y NaOAc a dos pH diferentes y temperaturas. Las concentraciones de ZnCl₂ oscilaron de 5 a 100 mM y NaOAc oscilaron de 10 a 100 mM. La concentración de MgCl₂ osciló de 5 a 100 mM en NaOAc de 10 mM. La concentración de CaCl₂ osciló de 5 a 100 mM en NaOAc de 10 mM.

Se realizó cristalización usando el método discontinuo como se ha descrito en el Ejemplo 2, excepto que cada lote tuvo un volumen de muestra de 1 ml.

Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 2. Las combinaciones de ZnCl₂ y NaOAc fueron eficaces para formar cristales y/o geles con cristales de anticuerpo anti-VEGF de longitud completa. El material sólido fue positivo para el material cristalino como se ha determinado por refracción de luz birrefringente. La concentración de anti-VEGF en el sobrenadante se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm.

Tabla 2

ZnCl ₂ (mM)	NaOAc (mM)	pH	Temperatura (°C)	Observaciones	conc. de anti-VEGF (g/l)	Cristales birrefringentes
5	10	4,7	4	película	43	sí
10	10	4,7	4	película	44	sí
100	10	4,7	4	20 % de gel	16	sí
5	10	4,7	Ambiente	Película + sólidos	44	sí
10	10	4,7	Ambiente	Lotes de sólidos	43	sí
100	10	4,7	Ambiente	17 % de gel	18	sí
5	10	5,7	4	Película + sólidos	44	sí
10	10	5,7	4	Película + sólidos	42	sí
100	10	5,7	4	20 % de gel	4,3	sí
5	10	5,7	Ambiente	Película	43	sí
10	10	5,7	Ambiente	película y turbia	47	sí
100	10	5,7	Ambiente	17 % de gel	3,8	sí

Todas las combinaciones de ZnCl₂/NaOAc produjeron cristales de anti-VEGF en gel o libres en solución. Las soluciones cloruro de magnesio y acetato sódico no mostraron ningún efecto sobre anti-VEGF bajo estas condiciones (datos no mostrados). Una solución de cloruro de calcio y acetato sódico produjo cristales con anti-VEGF cuando el CaCl₂ fue 100 mM y NaOAc 10 mM a pH 4,7 y se incubó a 4 °C (datos no mostrados).

El material cristalino se aisló de la solución formada con ZnCl₂ 100 mM, y NaOAc 10 mM a pH 5,7, se incubó a temperatura ambiente. Los cristales se lavaron tres veces con NaOAc 20 mM y ZnCl₂ 20 mM, pH 5,7, y los cristales se disolvieron en agua. Diferentes cantidades de cristales resolubilizados en agua migraron sobre SDS-PAGE y se compararon con anti-VEGF antes de la cristalización. Los lavados de los cristales también se probaron para la presencia de anti-VEGF. Los resultados se muestran en la Figura 5. Los resultados muestran que los lavados fueron negativos para cualquier anti-VEGF mientras que los cristales resolubilizados tuvieron anti-VEGF. Cantidades crecientes de los cristales produjeron un aumento en el anti-VEGF detectado.

El anti-VEGF resolubilizado también se analizó por espectroscopía de masas y se comparó con anti-VEGF de control. Los espectros de masas de MALDI-TOF de anticuerpos intactos generalmente dieron un pico ancho a 150 kDa y no es fácil distinguir un anticuerpo de otros anticuerpos. Sin embargo, los espectros de masas de anticuerpos reducidos presentan alta sensibilidad por la cadena ligera. Como la masa de la cadena ligera es única para cada

producto de anticuerpo, las muestras se redujeron con TCEP y se analizaron en el modo positivo lineal. Para explicar diferencias de concentración, las dos primeras muestras se diluyeron 50 veces y las dos siguientes muestras se diluyeron 10 veces con solución de matriz de ácido sinapínico y se redujeron con TCEP a temperatura ambiente (2 h). Las muestras se aplicaron en puntos sobre la placa, se secaron al aire, se lavaron con 0,1% de TFA frío y se adquirieron los espectros de masas.

La masa molecular de la cadena ligera de anti-VEGF es 23433 Da y los espectros de masas de MALDI-TOF normalmente presentan una exactitud de masa de +/- 0,05 % en este intervalo de masa. Los espectros de la solución madre y el sobrenadante presentan patrones similares, es decir, un pico fuerte de cadenas ligeras individualmente y doblemente protonadas y una cadena pesada doblemente cargada débil (Figuras 7 D, A, y C). La solución de lavado (en las condiciones analizadas) no mostró la presencia de la cadena ligera (Figura 7B), mientras que la solución de cristal mostró los picos de la cadena ligera.

El análisis de digesto nativo de Lys-C de los cristales por MALDI-TOF-EM mostró muchos picos relacionados con anti-VEGF (además de productos de autodigestión de Lys-C). Sin embargo, el digesto de la primera solución de lavado también mostró algunos de los picos relacionados con anti-VEGF (datos no mostrados). Se observa generalmente una mayor sensibilidad con los digestos por MALDI-TOF-EM en comparación con proteína intacta.

En resumen, el anti-VEGF se observa claramente en los cristales, pero el primer lavado también puede contener una pequeña cantidad de anti-VEGF. Los resultados muestran que el anti-VEGF resolubilizado de cristales tuvo el mismo perfil de espectroscopía de masas que el anti-VEGF de control.

Ejemplo 4

25 Investigación de fases líquidas de gel de soluciones anti-VEGF

Se han identificado dos fases en soluciones que contienen cristales de anti-VEGF. Incluyen cristales libres en solución y geles que pueden contener cristales. La concentración de sobrenadante de anti-VEGF se refiere directamente a la fase de cristal presente. Cuando el gel está presente, las concentraciones de anti-VEGF soluble normalmente son inferiores a aproximadamente 10 g/l. Cuando el gel no está presente, las concentraciones de anti-VEGF soluble generalmente suben por encima de 40 g/l.

Se estudió el espacio de la fase de anti-VEGF de las condiciones de cristalización variando las concentraciones de NaOAc y las concentraciones de ZnCl₂ a pH 5,7. Explorando el espacio de fases puede ser posible identificar dónde la solución pasa de un gel a una fase líquida. Esto puede ayudar a encontrar las condiciones de cristalización óptimas para mejorar el rendimiento de cristales.

Materiales y métodos

40 Se usó una solución madre anti-VEGF de 84,4 g/l en agua Milli-Q® con soluciones madre 1 M de ZnCl₂ y NaOAc, pH 5,7, como componentes para estos experimentos de lotes de 1 ml. Se crearon veintidós (22) lotes, cada uno con una concentración de anti-VEGF de 42,2 g/l y ZnCl₂ y concentraciones de NaOAc que oscilaban de 5 a 100 mM y 10 a 100 mM, respectivamente (véase la Tabla 3).

45 Las soluciones se prepararon en tubos de polipropileno que se almacenaron a temperatura ambiente. Hubo dos conjuntos diferentes de los 22 llevados a cabo, un conjunto no se mezcló y un conjunto se inclinó durante dos veces al día para proporcionar mezcla suave. Los tubos se observaron durante el transcurso de tres semanas. El porcentaje de gel formado se determinó visualmente en el conjunto no mezclado al principio y al final de las tres semanas. Después de 21 días, los tubos se centrifugaron y la concentración de anti-VEGF en el sobrenadante se analizó por A280.

Resultados

55 La Tabla 3 muestra los resultados del conjunto no mezclado, o estático, de las 22 muestras.

Tabla 3

Concentración de ZnCl ₂ (mM)	Concentración de NaOAc, pH 5,7 (mM)	% de gel inicial	% de gel final	Concentración de anti-VEGF en el sobrenadante (g/l)
5	10	0	0	43
5	100	20	0	43
10	10	0	0	47
10	50	0	0	48
10	75	0	0	47

ES 2 531 155 T3

10	100	25	0	44
25	10	0	0	42
25	25	15	0	43
25	50	45	0	44
25	75	25	20	7,1
25	100	25	20	4,3
40	10	0	0	49
40	25	0	15	47
40	50	20	40	6,0
40	75	20	20	2,5
60	10	15	20	18
60	25	30	40	6,8
60	50	35	40	2,9
60	75	40	20	1,3
80	10	40	40	9,4
80	25	45	40	3,0
100	10	65	20	3,8
100	100	35	20	0,7

En el conjunto mezclado de tubos, el % de gel no pudo cuantificarse debido a que la fase de gel se extendió a lo largo de los tubos. Sin embargo, se determinó una indicación visual del estado de la solución, clara, gel, sólidos libres, o gel + sólidos libres al principio y al final de los 21 días. Después de 21 días, los tubos se centrifugaron y la concentración de anti-VEGF en el sobrenadante se analizó por A280. La Tabla 4 muestra los resultados del conjunto inclinado (mezclado) dos veces al día de 22 muestras.

Tabla 4

Concentración de ZnCl ₂ (mM)	Concentración de NaOAc, pH 5,7 (mM)	Observaciones iniciales	Observaciones finales	Concentración de anti-VEGF en el sobrenadante (g/l)
10	50	Clara	Sólidos libres	49
10	75	Clara	Sólidos libres	48
10	100	Sólidos libres	Sólidos libres	47
15	50	Clara	Sólidos libres	45
20	50	Clara	Sólidos libres	47
25	25	Clara	Sólidos libres	45
25	50	Clara	Sólidos libres	42
25	75	Gel	Gel + sólidos	8,1
40	10	Clara	Sólidos libres	44
40	25	Gel	Gel	20
40	50	Gel	Gel	6,5
40	75	Gel	Gel	3,2
50	10	Clara	Clara	43
50	25	Gel	Gel	11
60	5	Clara	Gel	27
60	10	Gel	Gel + sólidos	22
60	25	Gel	Gel	8,2
60	50	Gel	Gel	2,2
60	75	Gel	Gel	1,4
80	10	Gel	Gel	8,8
80	25	Gel	Gel	3,8
100	1	Gel + sólidos	Gel + sólidos	10
100	5	Gel + sólidos	Gel + sólidos	9,2
100	10	Gel	Gel	4,8

Se formaron cristales en todos los tubos. Algunos de los cristales estuvieron libres en solución y algunos estuvieron en un gel.

5 El mapa de fases para las muestras no mezcladas se generó representando la concentración de $ZnCl_2$ contra la concentración de NaOAc. Esta representación puede observarse en la Figura 3. La Figura 4 compara los mapas de fases para los experimentos de mezcla y no mezcla.

10 Tomadas conjuntamente, las Figuras 1 (del Ejemplo 1), 3 y 4 muestran que a medida que el sistema se aproxima al punto de transición de fases, el anti-VEGF soluble disminuye a aproximadamente 10 - 22 g/l cuando el $ZnCl_2$ está por encima de 40 mM y los tubos están mezclándose. Cuando los tubos están estáticos y las concentraciones de $ZnCl_2$ son 40 mM o menos, hay de poca disminución a ninguna en las concentraciones de anti-VEGF soluble. Esto podría conducir a creer que el $ZnCl_2$ es el factor dominante en la pérdida de anti-VEGF soluble. Cuando la concentración de $ZnCl_2$ es inferior a 10 mM o superior a 80 mM, el efecto de NaOAc se reduce. A medida que las concentraciones de $ZnCl_2$ se aproximan a los puntos de transición (25-60 mM), concentraciones de NaOAc parecen tener un mayor efecto sobre la concentración de anti-VEGF soluble.

Ejemplo de referencia 5

Cristalización de otros anticuerpos

20 Las condiciones de cristalización del estado de la técnica para anticuerpos de longitud completa normalmente utilizan un precipitante orgánico tal como PEG, MPD o propanol. Los presentes inventores han descubierto (véanse los ejemplos previos) que los anticuerpos de longitud completa tales como anti-VEGF pueden cristalizarse en ausencia de estos precipitantes orgánicos. Los presentes inventores examinaron si otros anticuerpos de longitud completa podrían cristalizarse con un catión divalente en presencia de NaOAc (pH 4,7; pH 5,7), HEPES (pH 7,5) o Tris (pH 9,0).

Materiales y métodos

30 Los anticuerpos monoclonales que se probaron son: anti-HER2, anti-CD11a, anti-CD20 (C2B8) y anti-VEGF (Genentech, South San Francisco, CA). La preparación y caracterización de un anticuerpo con estas especificidades se ha descrito en las patentes de EE.UU. N° 5.736.137, 6.387.371, 6.037.454 y el documento WO 98/45331. Los anticuerpos se purificaron usando tres tipos de cromatografía seguida de ultrafiltración y diafiltración similar a las etapas de purificación descritas en el Ejemplo 1.

35 Los anticuerpos monoclonales se dializaron en agua Milli-Q® dando concentraciones resultantes de entre aproximadamente 80 - 100 mg/ml. Los experimentos se realizaron en modo discontinuo combinando 1 parte de solución de anticuerpo con 1 parte de cada solución apropiada. Volúmenes de muestra finales fueron de 1 a 2 ml. Las muestras se almacenaron en tubos de polipropileno de 6 ml.

40 Las sales divalentes que se usaron fueron $ZnCl_2$, $CaCl_2$ y $MgCl_2$. Los tampones que se usaron tuvieron concentraciones finales y pH respectivamente de: NaOAc 10 mM, pH 4,7; NaOAc 10 mM, pH 5,7; HEPES 10 mM (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico), pH 7,5, y Tris 10 mM (tris-hidroximetilamino-etano), pH 9,0. Las muestras que contienen la solución de tampón de Tris se almacenaron a temperatura ambiente, y las muestras con las otras soluciones de tampón se almacenaron a temperaturas de 2-8 °C.

45 Las muestras se sometieron a inspecciones visuales diarias. Si no se observó material sólido después de 3 días de almacenamiento, la temperatura se desplazó radicalmente: las muestras se transfirieron a 2-8 °C o temperatura ambiente dependiendo de las condiciones de almacenamiento iniciales. Si no se observó material sólido después de 50 3 días adicionales, las muestras se almacenaron a 2-8 °C y se monitorizaron semanalmente. Las muestras con material sólido se sometieron a visualización bajo polarizadores cruzados para determinar la birrefringencia.

Resultados

55 No se observaron cristales en las condiciones probadas para la molécula de anti-CD40 (datos no mostrados).

Los resultados para la molécula de anti-CD20 (C2B8) con $ZnCl_2$ se muestran en la Tabla 5. Ningún sólido fue cristalino basándose en birrefringencia. Sin embargo, en algunos casos, se formaron geles de proteína. No se observaron cristales en las condiciones probadas para la molécula de anti-CD20 (C2B8) con $CaCl_2$ y $MgCl_2$ (datos no mostrados). N/A en las tablas indicó que no se probó la absorbancia del sobrenadante a 280 nm.

60

Tabla 5

ZnCl ₂ (mM)	NaOAc (mM)	pH	Temperatura (°C)	Observaciones	Anti-CD20 (C2B8) en sobrenadante por A280 (g/l)
5	10	4,7	2-8	Clara	42
10	10	4,7	2-8	Clara	42
100	10	4,7	2-8	25 % de gel	13
5	10	4,7	ambiente	Clara	N/a
10	10	4,7	ambiente	Clara	N/a
100	10	4,7	ambiente	Opalescente + 20 % de gel	N/a
5	10	5,7	2-8	Clara	42
10	10	5,7	2-8	Clara	43
100	10	5,7	2-8	75 % de sólido blanco	2,1
5	10	5,7	ambiente	Clara	N/a
10	10	5,7	ambiente	Clara	N/a
100	10	5,7	ambiente	33% sólidos	N/a

5 Los resultados para la molécula de anti-HER2 con ZnCl₂ se muestran en la Tabla 6 a continuación. Ningún sólido formado en las condiciones mostradas a continuación fue cristalino como se ha determinado por birrefringencia. No se observaron cristales en las condiciones probadas para la molécula de anti-HER2 con CaCl₂ o MgCl₂ (datos no mostrados).

Tabla 6

ZnCl ₂ (mM)	NaOAc (mM)	pH	Temperatura (°C)	Observaciones	anti-HER2 en sobrenadante por A280 (g/l)
5	10	4,7	2-8	Clara	51
10	10	4,7	2-8	Clara	46
100	10	4,7	2-8	25 % de gel	18
5	10	4,7	ambiente	Clara	N/a
10	10	4,7	ambiente	Clara	N/a
100	10	4,7	ambiente	Opalescente	N/a
5	10	5,7	2-8	Clara	46
10	10	5,7	2-8	Clara	47
100	10	5,7	2-8	60 % de sólidos	41
5	10	5,7	ambiente	Clara	N/a
10	10	5,7	ambiente	Clara	N/a
100	10	5,7	ambiente	Gel + sólidos	N/a

10 Los resultados para la molécula de anti-CD11a con ZnCl₂ se muestran en la Tabla 7 a continuación. Ningún sólido formado bajo estas condiciones fue negativo para la formación de cristal como se ha determinado por birrefringencia. No se observaron cristales en las condiciones probadas para la molécula de anti-CD11a con CaCl₂ o MgCl₂ (datos no mostrados).

15

Tabla 7

ZnCl ₂ (mM)	NaOAc (mM)	pH	Temperatura (°C)	Observaciones	anti-CD11a en sobrenadante por A280 (g/l)
5	10	4,7	2-8	Clara	59
10	10	4,7	2-8	Clara	N/a
100	10	4,7	2-8	40 % de gel	13
5	10	4,7	ambiente	Clara	N/a
10	10	4,7	ambiente	Clara	N/a
100	10	4,7	ambiente	25 % de gel	N/a
5	10	5,7	2-8	Clara	47
10	10	5,7	2-8	Clara	56

ES 2 531 155 T3

100	10	5,7	2-8	75 % de sólido blanco	2,3
5	10	5,7	ambiente	Clara	N/a
10	10	5,7	ambiente	Clara	N/a
100	10	5,7	ambiente	25 % de gel + sólidos	N/a

Los resultados para la molécula de anti-VEGF con ZnCl₂ se muestran en la Tabla 8 y para MgCl₂ en la Tabla 9 a continuación. Se formaron cristales y geles bajo estas condiciones. No todos los precipitados fueron positivos para el material cristalino por luz birrefringente. No se observaron cristales en las condiciones probadas para la molécula de anti-VEGF con CaCl₂ (datos no mostrados).

5

Tabla 8

ZnCl ₂ (mM)	NaOAc (mM)	pH	Temperatura (°C)	Observaciones	anti-VEGF en sobrenadante por A280 (g/l)	Cristales birrefringentes
5	10	4,7	2-8	Película	42,8	sí
10	10	4,7	2-8	Película	43,5	sí
100	10	4,7	2-8	20 % de gel	16,0	sí
5	10	4,7	ambiente	Película + sólidos	44,2	sí
10	10	4,7	ambiente	Lotes de sólidos	42,6	sí
100	10	4,7	ambiente	17 % de gel	18,4	sí
5	10	5,7	2-8	Película + sólidos	43,9	sí
10	10	5,7	2-8	Película + sólidos	41,8	sí
100	10	5,7	2-8	20 % de gel	4,3	sí
5	10	5,7	ambiente	Película	43,1	sí
10	10	5,7	ambiente	Película + turbio	46,6	sí
100	10	5,7	ambiente	17 % de gel	3,8	sí

Tabla 9

MgCl ₂ (mM)	Tampón 10 mM	pH	Temperatura (°C)	Observaciones	anti-VEGF en sobrenadante por A280 (g/l)
5	NaOAc	4,7	2-8	Clara	51
10	NaOAc	4,7	2-8	Clara	N/a
100	NaOAc	4,7	2-8	Clara	52
5	NaOAc	4,7	ambiente	Clara	N/a
10	NaOAc	4,7	ambiente	Clara	N/a
100	NaOAc	4,7	ambiente	Clara	N/a
5	NaOAc	5,7	2-8	Clara	51
10	NaOAc	5,7	2-8	Clara	N/a
100	NaOAc	5,7	2-8	Clara	50
5	NaOAc	5,7	ambiente	Clara	N/a
10	NaOAc	5,7	ambiente	Clara	N/a
100	NaOAc	5,7	ambiente	Clara	N/a
5	HEPES	7,5	2-8	Partículas finas	44
50	HEPES	7,5	2-8	Algún precipitado blanco	42
100	HEPES	7,5	2-8	Partículas blancas	42
5	HEPES	7,5	ambiente	Partículas finas	44
50	HEPES	7,5	ambiente	Partículas finas	43
100	HEPES	7,5	ambiente	Partículas finas	43
5	Tris	9,0	2-8	Partículas finas	44
50	Tris	9,0	2-8	Partículas finas	44
100	Tris	9,0	2-8	Partículas finas/birrefringencia-cristales similares a pequeños erizos de mar	51
5	Tris	9,0	ambiente	Partículas finas	41
50	Tris	9,0	ambiente	Partículas finas/birrefringencia-cristales similares a pequeños erizos de mar	44
100	Tris	9,0	ambiente	Partículas finas/birrefringencia-cristales similares a pequeños erizos de mar	42

10

De los resultados anteriores parece como si la combinación de mayores concentraciones de $ZnCl_2$ y de NaOAc, y pH de 4,7 y 5,7, indujera cambios en la fase de anti-HER2, anti-CD20 (C2B8) y anti-CD11a de anticuerpo soluble a geles de anticuerpo. Todas las combinaciones de $ZnCl_2$ /NaOAc produjeron cristales cuando se añadieron a anti-VEGF.

5 Solo se investigaron $MgCl_2$ y $CaCl_2$ a pH 7,5 y pH 9,0 (resultados para $CaCl_2$ no mostrados). Basándose en los resultados anteriores, se observó cristalización de anti-VEGF en Tris 10 mM, $MgCl_2$ 50 mM, pH 9,0, a temperatura ambiente; y en Tris 10 mM, $MgCl_2$ 100 mM, pH 9,0, a tanto temperatura ambiente como a 2-8 °C.

10 Ejemplo 6

Uso de precipitantes en condiciones de cristalización

15 Los presentes inventores examinaron si los presentes inventores podrían incorporar aditivos en condiciones de cristalización para anti-VEGF. Las condiciones de cristalización que se usaron fueron $ZnCl_2$ 10 mM y NaOAc 10 mM, a un pH de 5,7.

20 Ya se había mostrado que la cristalización usando $ZnCl_2$ 10 mM y NaOAc 10 mM a un pH de 5,7 producía cristales de anti-VEGF. En un intento por aumentar el rendimiento, los tres precipitantes orgánicos más eficaces (determinados a partir del cribado) se añadieron a los tampones de cristalización. Los precipitantes que se probaron fueron (+/-)-2-metil-2,4-pentanodiol (MPD) comprado de Hampton Research, polietilenglicol (PEG) 3350 comprado de Hampton Research y propanol comprado de Hampton Research.

25 Cada uno de los precipitantes se añadió a un tubo de polipropileno que contenía una solución de anti-VEGF (Genentech, South San Francisco, CA) en agua Milli-Q® dando una concentración resultante de 42,4 g/l de anti-VEGF, $ZnCl_2$ 10 mM, NaOAc 10 mM, a un pH de 5,7, y los porcentajes de los precipitantes facilitados en la Tabla 10 a continuación.

30 Los tubos de polipropileno se colocaron a temperatura ambiente y se inclinaron dos veces al día para proporcionar mezcla suave. Después de dos semanas, se recogieron muestras de sobrenadante y la concentración de anti-VEGF se analizó por A280.

Resultados

35 Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Precipitante	%	Cristales	Concentración de anti-VEGF en sobrenadante (g/l)
PEG 3350	0,5	Sí	52
PEG 3350	1	Sí	48
PEG 3350	5	Sí	49
Propanol	0,5	Sí	41
Propanol	1	Sí	47
Propanol	5	Sí	46
MPD	0,5	Sí	53
MPD	1	Sí	48
MPD	5	Sí	45

40 Se observaron cristales en todos los tubos de los lotes. Las concentraciones de sobrenadante medidas estuvieron entre 41 y 53 g/l en todos los tubos de polipropileno. Se produjo cristalización, pero no pareció aumentar mediante la adición de estos precipitantes. La Figura 6 muestra la concentración de sobrenadante en función de la concentración de precipitante para tres precipitantes diferentes. Se determinó que la adición de MPD, PEG 3350 o propanol no parece mejorar significativamente el rendimiento con respecto al rendimiento usando $ZnCl_2$ 10 mM y NaOAc 10 mM a pH 5,7.

45 Ejemplo de referencia 7

Cristalización de otros anticuerpos monoclonales

50 Los presentes inventores examinaron si pueden usarse mezclas de $ZnCl_2$ y NaOAc como condiciones de cristalización genéricas para anticuerpos monoclonales.

- Las condiciones de cristalización que se han identificado en el presente documento para anti-VEGF no contienen polietilenglicol. Todas las otras condiciones informadas en la bibliografía usan polietilenglicol en su método de cristalización. En experimentos pasados, otros anticuerpos han sido afectados por estas condiciones gelificando o precipitando en solución. En este experimento, se estudiaron mayores concentraciones de $ZnCl_2$ con el fin de estudiar el espacio de fase del anticuerpo e identificar condiciones de cristalización.

Materiales y métodos

- Los anticuerpos que se compararon fueron anti-HER2, anti-CD11a, anti-2C4, anti-CD20 (2H7), anti-CD20 (C2B8) y anti-VEGF. Todos los anticuerpos se diafiltraron en agua Milli-Q® y se concentraron a ~100 mg/ml. Los experimentos se realizaron en modo discontinuo, combinando 1 parte de solución de anticuerpo con 1 parte de solución. El volumen de muestra final fue de aproximadamente 3-5 ml, y las muestras se almacenaron en tubos de polipropileno de 6 ml sin ningún control de proteína. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente y a aproximadamente 2-8 °C. Las muestras se inspeccionaron diariamente. Si no se observaron cristales o precipitado después de 3 días de almacenamiento, la temperatura se desplazó radicalmente: las muestras se transfirieron a 2-8 °C o temperatura ambiente dependiendo de las condiciones de almacenamiento iniciales. Si no se observó nada después de 3 días adicionales, las muestras se almacenaron a aproximadamente 2-8 °C y se monitorizaron semanalmente.
- Las soluciones tuvieron concentraciones variables de $ZnCl_2$, $CaCl_2$ y $MgCl_2$ y todas tuvieron NaOAc 0,01 M y tuvieron un pH de tanto 4,7 como 5,7.

Resultados

- Los resultados para la molécula de anti-VEGF en $ZnCl_2$ se muestran en la Tabla 11. No se observaron cristales usando $MgCl_2$ o $CaCl_2$ bajo estas condiciones (datos no mostrados).

Tabla 11

ZnCl ₂ (mM)	NaOAc (mM)	pH	Temperatura (°C)	Observaciones	Cristales birrefringentes
75	10	4,7	ambiente	Gel	No
90	10	4,7	ambiente	Gel	1 ó 2 posibles cristales
120	10	4,7	ambiente	Gel denso	Gel
75	10	4,7	2-8	Gel sólido	Cristal pequeño
90	10	4,7	2-8	Gel sólido	Cristal pequeño
120	10	4,7	2-8	Gel denso	Cristal
25	10	5,7	ambiente	Gel denso	No
50	10	5,7	ambiente	Gel denso	Pequeñas gotitas de gel
75	10	5,7	ambiente	Gel suelto	Gel
25	10	5,7	2-8	Gel sólido	Cristal
50	10	5,7	2-8	Gel sólido	Muchos cristales pequeños
75	10	5,7	2-8	½ gel	Muchos cristales pequeños

- Los resultados para las moléculas de anti-CD20 (C2B8) y anti-2C4 no mostraron formación de cristales o geles bajo ninguna de las condiciones probadas (datos no mostrados).

- Los resultados para la molécula de anti-CD20 (2H7) se muestran en la Tabla 12 ($ZnCl_2$), Tabla 13 ($CaCl_2$) y Tabla 14 ($MgCl_2$) a continuación. En muchos casos, se formaron geles de proteína. El material precipitado no fue cristalino como se ha determinado por birrefringencia.

Tabla 12

ZnCl ₂ (mM)	NaOAc (mM)	pH	Temperatura (°C)	Observaciones	Cristales birrefringentes
75	10	4,7	ambiente	Clara	No
90	10	4,7	ambiente	Gel poco consistente	No
120	10	4,7	ambiente	Gel	No
75	10	4,7	2-8	Precipitado	No
90	10	4,7	2-8	Precipitado	No
120	10	4,7	2-8	Precipitado	No
25	10	5,7	ambiente	Precipitado granular	No
50	10	5,7	ambiente	Precipitado	No
75	10	5,7	ambiente	Precipitado	No

ES 2 531 155 T3

25	10	5,7	2-8	Gel	No
50	10	5,7	2-8	Gel denso	No
75	10	5,7	2-8	Gel denso	No

Tabla 13

CaCl ₂ (mM)	NaOAc (mM)	pH	Temperatura (°C)	Observaciones	Cristales birrefringentes
200	10	4,7	ambiente	Opalescente, sólidos blancos	no
500	10	4,7	ambiente	Gel	no
200	10	4,7	2-8	Gel denso opalescente	no
500	10	4,7	2-8	Gel denso opalescente	no
200	10	5,7	ambiente	Gel denso	no
500	10	5,7	ambiente	Gel denso opalescente	no
200	10	5,7	2-8	Gel denso	no
500	10	5,7	2-8	Gel denso	no

Tabla 14

MgCl ₂ (mM)	NaOAc (mM)	pH	Temperatura (°C)	Observaciones	Cristales birrefringentes
200	10	4,7	ambiente	Gel diminuto	no
500	10	4,7	ambiente	Gel denso	no
200	10	4,7	2-8	Gel denso	no
500	10	4,7	2-8	Gel denso	no
200	10	4,7	ambiente	Gel diminuto	no
500	10	4,7	ambiente	Gel denso	no
200	10	5,7	2-8	Gel denso	no
500	10	5,7	2-8	Gel denso	no

5

Los resultados para la molécula de anti-HER2 se muestran en la Tabla 15 (ZnCl₂) a continuación. No se observaron cristales usando MgCl₂ o CaCl₂ bajo estas condiciones (datos no mostrados).

Tabla 15

ZnCl ₂ (mM)	NaOAc (mM)	pH	Temperatura (°C)	Observaciones	Cristales birrefringentes
75	10	4,7	Ambiente	Lechoso claro	No
90	10	4,7	Ambiente	Lechoso claro	No
120	10	4,7	Ambiente	Opalescente	No
75	10	4,7	2-8	Clara	No
90	10	4,7	2-8	Opalescente	No
120	10	4,7	2-8	Pequeñas partículas sólidas	Débilmente birrefringente
25	10	5,7	Ambiente	Lechoso claro	No
50	10	5,7	Ambiente	Lechoso claro	No
75	10	5,7	Ambiente	Gel	No
25	10	5,7	2-8	Clara	No
50	10	5,7	2-8	Gel	No
75	10	5,7	2-8	Gel blando	No

10

Los resultados para la molécula de anti-CD11a se muestran en la Tabla 16 (ZnCl₂) a continuación. No se observaron cristales usando MgCl₂ o CaCl₂ bajo estas condiciones (datos no mostrados).

Tabla 16

ZnCl ₂ (mM)	NaOAc (mM)	pH	Temperatura (°C)	Observaciones	Cristales birrefringentes
75	10	4,7	ambiente	Clara	No
90	10	4,7	ambiente	Clara	No
120	10	4,7	ambiente	Opalescente	No
75	10	4,7	2-8	Clara	No
90	10	4,7	2-8	Clara	No
120	10	4,7	2-8	Precipitado	No
25	10	5,7	ambiente	Clara	No
50	10	5,7	ambiente	Clara	No
75	10	5,7	ambiente	Gel/sólido	No
25	10	5,7	2-8	Clara	No
50	10	5,7	2-8	Opalescente	No
75	10	5,7	2-8	Precipitado	No

Estos resultados muestran que los diferentes anticuerpos pueden tanto formar cristales como geles cuando se ponen en contacto con ZnCl₂ y NaOAc.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de cristales de bevacizumab adecuado para aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico que comprende:
- 5 a) poner en contacto bevacizumab con una solución; e
b) incubar el bevacizumab y la solución hasta que se forman cristales de bevacizumab, en el que la solución:
- 10 (i) comprende $ZnCl_2$ de 1 a 120 mM; o
(ii) comprende $ZnCl_2$ y tampón acetato sódico (NaOAc); o
(iii) comprende $ZnCl_2$ y carece de otros precipitantes; o
(iv) comprende Tris 10 mM y $MgCl_2$ 50-100 mM a pH 9,0 y la incubación se realiza a temperatura ambiente; o
15 (v) comprende Tris 10 mM y $MgCl_2$ 100 mM a pH 9,0 y la incubación se realiza a una temperatura entre 2 °C y temperatura ambiente.
2. El método según la reivindicación 1, parte (ii) o (iii), en el que la solución comprende $ZnCl_2$ de 1 a 500 mM y tampón acetato sódico 1 a 100 mM (NaOAc).
- 20 3. El método de la reivindicación 1, parte (i) o (ii), o la reivindicación 2 como dependiente de la reivindicación 1, parte (i) o (ii), en donde la solución no incluye precipitantes orgánicos o poliméricos.
4. El método de la reivindicación 1, parte (i), (ii) o (iii), la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde la solución comprende $ZnCl_2$ de 10 mM a 80 mM.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en el que la solución comprende $ZnCl_2$ de 25 mM a 60 mM.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la solución comprende NaOAc de 1 mM a 100 mM.
- 30 7. El método de la reivindicación 6, en el que el tampón comprende NaOAc de 25 mM a 75 mM.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la solución comprende $ZnCl_2$ superior a 10 mM y NaOAc superior a 5 mM.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en el que la solución comprende $ZnCl_2$ 100 mM y NaOAc 10 mM.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la solución se tampona a un pH de al menos 4,7.
- 40 11. El método de la reivindicación 10, en el que la solución se tampona a un pH de aproximadamente 4,7 a 5,7.
12. El método de la reivindicación 1, parte (iv), en el que la concentración de $MgCl_2$ es 50 mM.
- 45 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la incubación es a temperatura ambiente.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 como finalmente dependiente de la reivindicación 1, partes (i), (ii), (iii) o (v), en el que la incubación es a 2-8 °C.
- 50 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el anticuerpo es bevacizumab de longitud completa.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además la etapa de:
- 55 c) combinar los cristales con vehículos y/o componentes para formar composiciones y/o formulaciones.

FIG.1

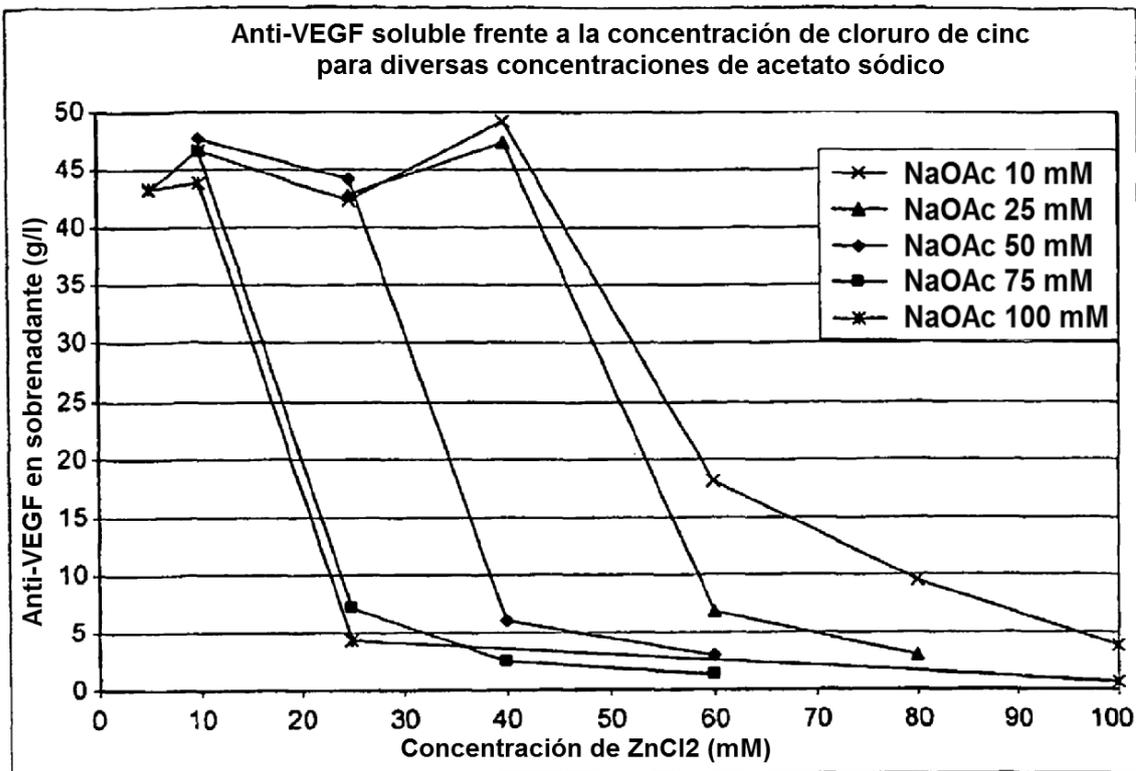


FIG. 2a

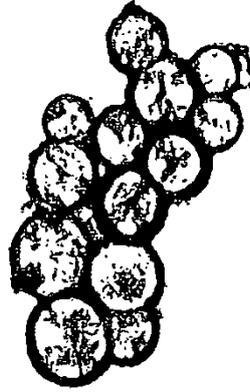


FIG. 2b

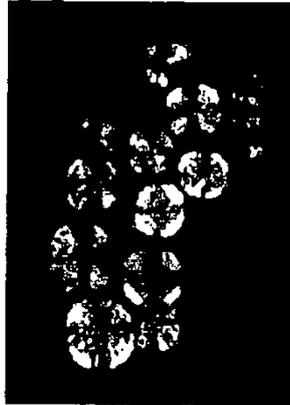


FIG. 2c



FIG. 2d



FIG. 2e

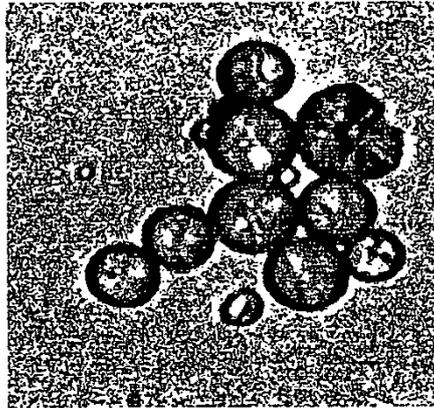


FIG. 2f

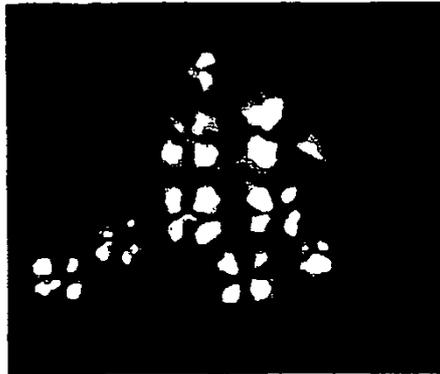


FIG.3

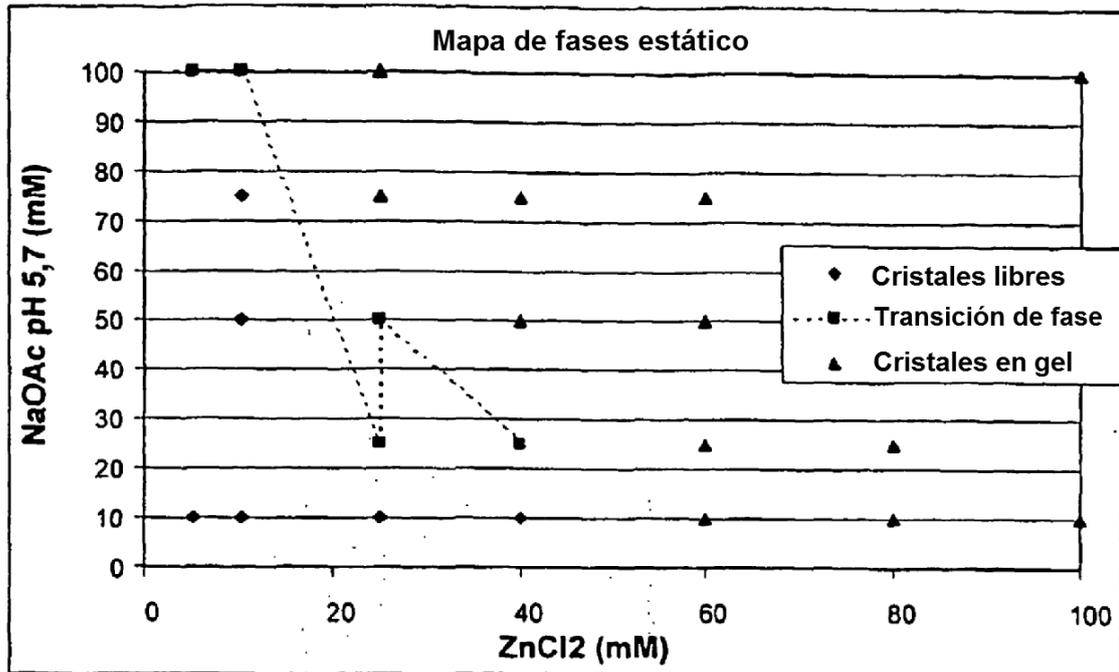


FIG.4

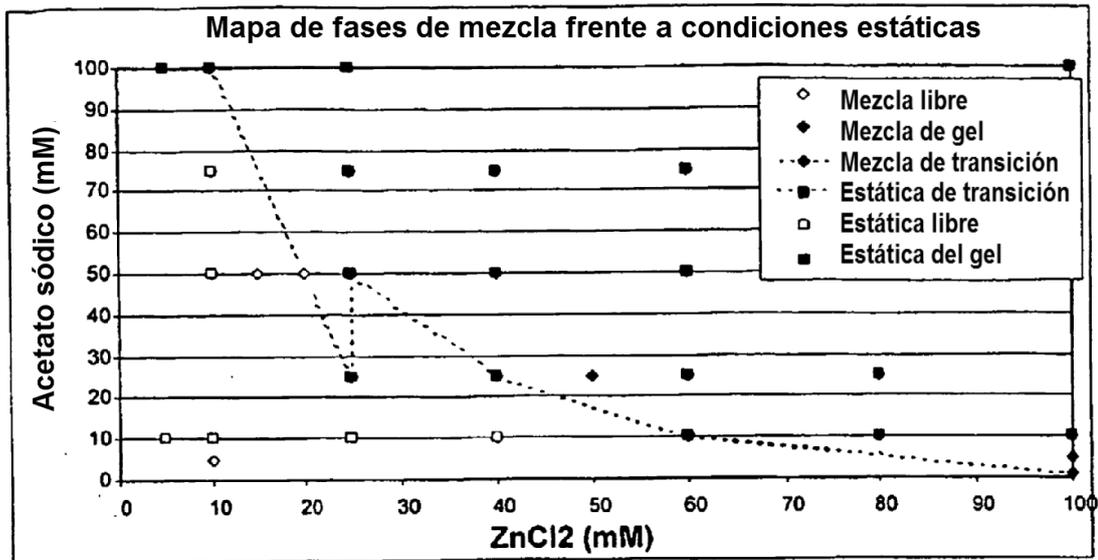


FIG. 5

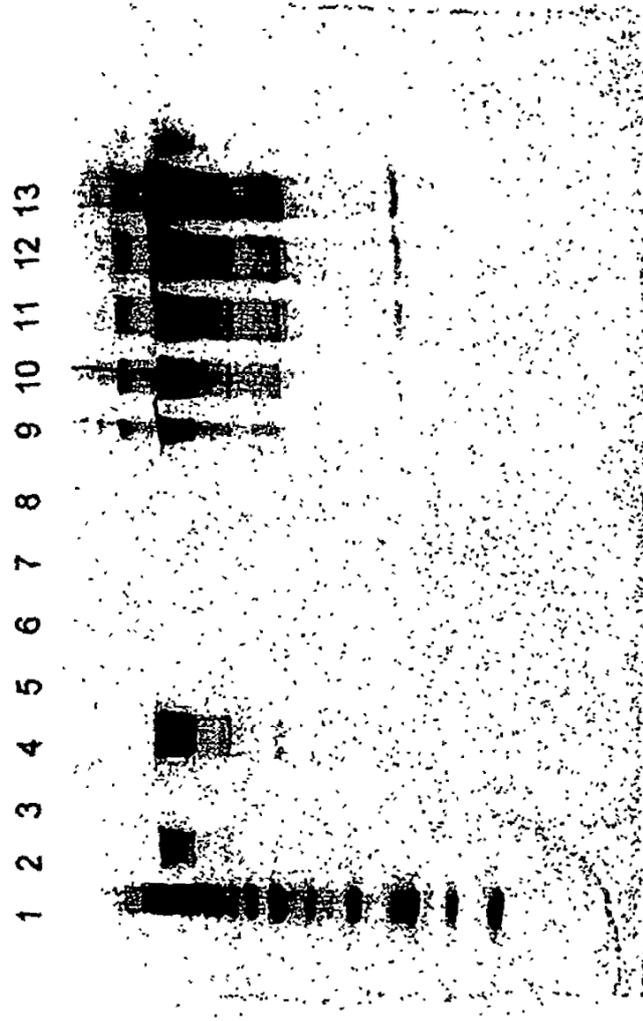


FIG.6

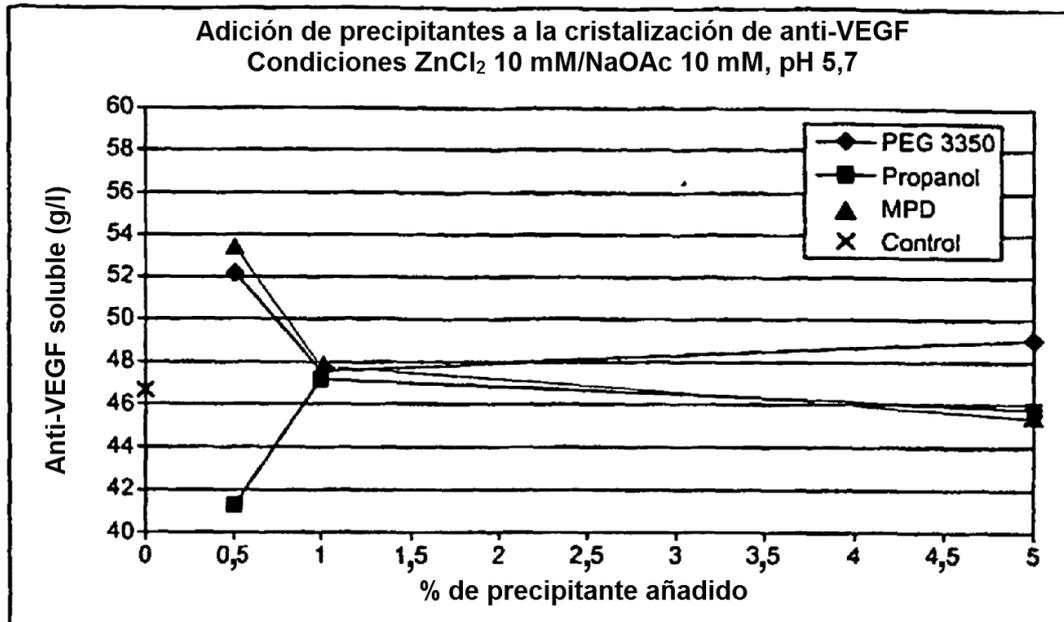


FIG.7A

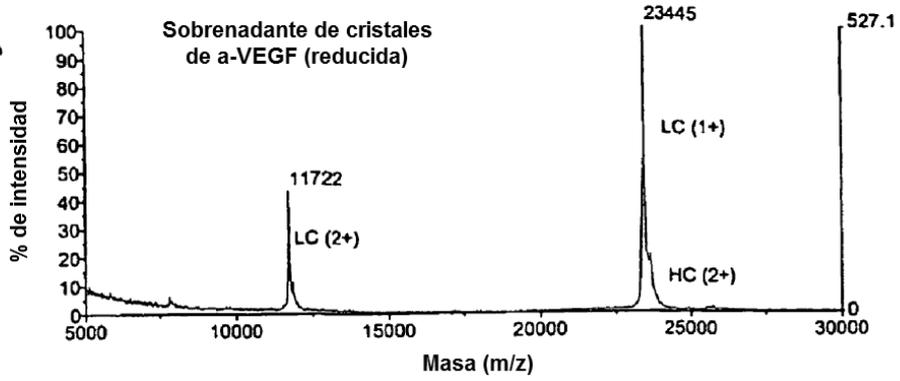


FIG.7B

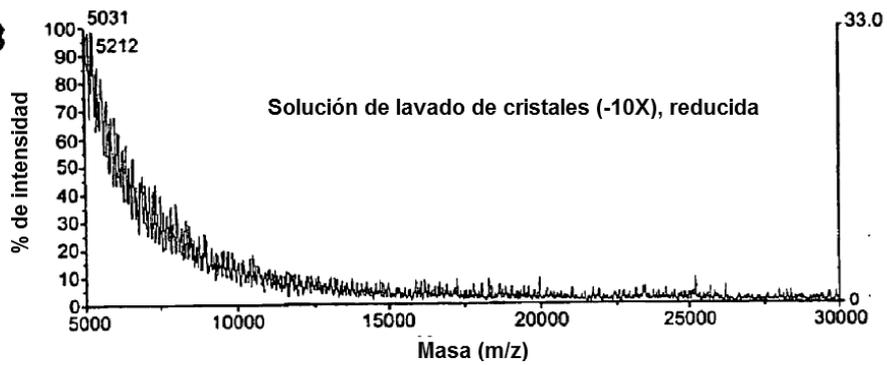


FIG.7C

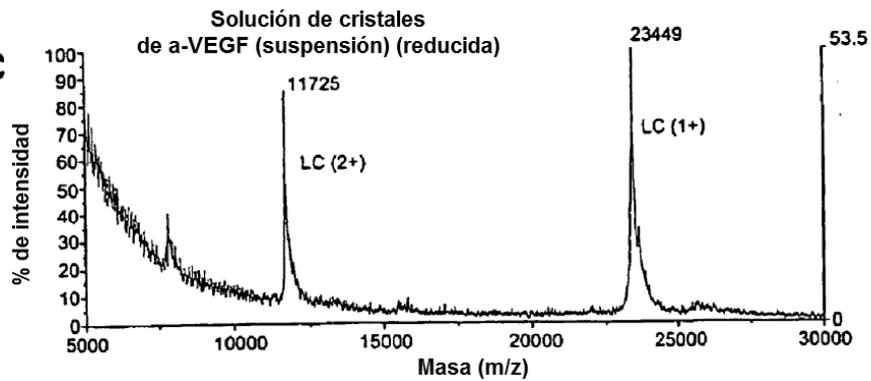


FIG.7D

