

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 468**

51 Int. Cl.:

C07K 1/30 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2018 PCT/US2018/022387**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2018 WO18170098**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2018 E 18718959 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.01.2022 EP 3596101**

54 Título: **Métodos dirigidos a biomoléculas cristalinas**

30 Prioridad:

14.03.2017 US 201762471358 P

24.03.2017 US 201762476359 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2022

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)

One Amgen Center Drive

Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72 Inventor/es:

SHARNEZ, RIZWAN;

TRIEU, WILLIAM;

CAPORINI, MARC A.;

KELLY, RON C.;

BURT, NEILL;

NICHOLSON, LAURA y

CHRISTIAN, TWINKLE R.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 906 468 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

Métodos dirigidos a biomoléculas cristalinas

5 Los anticuerpos constituyen agentes terapéuticos potentes caracterizados por efectos secundarios limitados debido a su capacidad de dirigirse específicamente a un antígeno distintivo en una célula, bacteria, virus o toxina. En 1986, el primer anticuerpo monoclonal terapéutico, Orthoclone OKT3, se introdujo en el mercado. Desde entonces, esta clase de productos biofarmacéuticos ha crecido significativamente. A finales de 2014, 47 productos de anticuerpo monoclonal habían recibido la aprobación en Estados Unidos o Europa para el tratamiento de una diversidad de enfermedades, incluyendo cáncer y enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, respiratorias e infecciosas. Dada la actual tasa de aprobación de aproximadamente cuatro productos al año, se estima que aproximadamente 70 productos de anticuerpo monoclonal estarán disponibles en el mercado en 2020. Véase, Ecker *et al.*, MABs 7(1): 9-14 (2015).

15 Aunque se informa de que se prevé que el mercado proyectado de anticuerpos en los Estados Unidos aumente hasta más de 10 000 millones de dólares americanos, la producción de dichos productos terapéuticos no está carente de limitaciones. Una desventaja de los anticuerpos terapéuticos es el coste del procesamiento posterior para conseguir los altos niveles de pureza requeridos. Aunque pueden conseguirse niveles de pureza mayores de un 90 % mediante cromatografía con proteína A, el coste del medio de adsorción es un inconveniente principal. Otro factor limitante de los anticuerpos terapéuticos es la sensibilidad de la estructura de anticuerpo a la desnaturalización química y física encontrada durante el suministro y el almacenamiento. Aunque los investigadores han desarrollado estrategias para mejorar la estabilidad de las formulaciones de anticuerpo, algunos de estos métodos dan lugar a una pérdida de actividad proteínica y/o coste mayor debido al gasto adicional de vehículos o formulaciones estabilizantes de las proteínas.

25 La cristalización de proteínas se reconoce en principio como un método eficaz y que se puede cambiar de escala de purificación de proteínas. Las proteínas cristalinas ofrecen mayor estabilidad con respecto a sus equivalentes de solución de proteínas y, por tanto, tienen vidas útiles más largas. La purificación de proteínas a través de cristalización se ha mostrado factible mediante productos proteínicos de ensayo, incluyendo ovalbúmina y una lipasa. La insulina es la única proteína terapéutica cristalizada a escala industrial. La cristalización de anticuerpos aún no es rutinaria, debido a complicaciones en su comportamiento de fases. Puede producirse precipitación, separación de fases y formación de fases similares a gel y " atrapar cinéticamente el sistema lejos del equilibrio y, como consecuencia, reducir el rendimiento de proteína cristalina o inhibir la formación de cristales completamente". Véase, Zang *et al.*, PLOS One 6(9): e25282 (2011). Las técnicas de purificación convencionales tales como filtración en flujo tangencial y flujo alterno no son adecuadas para la purificación por cristalización de proteínas a causa de obstrucción de la membrana (es decir, los cristales taponan los poros del medio de filtro). Además, la alta presión requerida para mantener el flujo a través del filtro puede dar lugar a cizallamiento excesivo, rotura y compactación de los cristales. Cuando la proteína es un anticuerpo, estos problemas se exacerban porque los cristales de dichas proteínas son pegajosos y frágiles.

40 Por tanto, hay una necesidad en la técnica de métodos eficaces de preparación de composiciones que comprendan anticuerpos cristalinos.

El documento WO 2005/005460 divulga un método de lavado y concentración de precipitados proteínicos.

45 Sumario

La invención se define en las reivindicaciones. Los métodos divulgados son ventajosos, porque las etapas suceden en un sistema cerrado de bajo cizallamiento, y en condiciones de procesamiento asépticas. Pueden realizarse múltiples etapas en el mismo aparato, evitando de ese modo la pérdida de producto tras la transferencia a diferentes aparatos. Debido al entorno de bajo cizallamiento mantenido por todos los métodos descritos en este documento, las biomoléculas cristalinas pueden permanecer separadas entre sí, minimizando de ese modo la formación de agregados. Los métodos divulgados pueden dar lugar a la obtención de una suspensión de cristalinos homogénea que pueden bombearse fácilmente en operaciones de procesamiento posteriores, tales como llenado.

55 En realizaciones ejemplares, el método de preparación de una composición que comprende biomoléculas cristalinas comprende formar un lecho fluido de biomoléculas cristalinas en una cámara giratoria que comprende una entrada y una salida. Sin limitarse a teoría particular alguna, se cree que el lecho fluido se crea rotando la cámara alrededor de un eje sustancialmente horizontal para crear una fuerza centrífuga ($F_{\text{centrífuga}}$) en dicha cámara, haciendo fluir una primera corriente de una primera solución a través de la entrada en una dirección opuesta a la dirección de la $F_{\text{centrífuga}}$ y a un primer caudal (FR_1) que tiene una fuerza (F_{FR_1}) que contraequilibra $F_{\text{centrífuga}}$, y recogiendo la primera solución de la cámara mientras se mantiene sustancialmente la formación del lecho fluido de biomoléculas cristalizadas.

65 En realizaciones ejemplares, el método también comprende reemplazar la primera corriente de la primera solución con una segunda corriente de una segunda solución mientras se mantiene sustancialmente la formación del lecho fluido de biomoléculas cristalizadas. En aspectos ejemplares, el método comprende hacer fluir una segunda corriente de una segunda solución para reemplazar la primera corriente de la primera solución mientras se mantiene

sustancialmente la formación del lecho fluido de biomoléculas cristalizadas. En aspectos ejemplares, el método comprende hacer fluir una segunda corriente de una segunda solución a través de la entrada en una dirección opuesta a la dirección de la $F_{\text{centrífuga}}$ y a un caudal (FR) equivalente a FR1 que tiene una fuerza (F) igual a F_{FR1} , de modo que la fuerza de la segunda corriente contraequilibra $F_{\text{centrífuga}}$, y recoger la segunda solución de la cámara mientras se mantiene sustancialmente la formación del lecho fluido de biomoléculas cristalizadas.

En realizaciones ejemplares, el método comprende como alternativa o adicionalmente concentrar las biomoléculas cristalizadas dentro de una región de la cámara cambiando FR1 a un segundo caudal (FR2) que tiene una fuerza (F_{FR2}) que es menor que $F_{\text{centrífuga}}$ o aumentando la velocidad de rotación de la cámara para aumentar $F_{\text{centrífuga}}$ hasta un nivel que es mayor que F_{FR1} .

En aspectos ejemplares, el método comprende retirar las biomoléculas cristalinas de la cámara, por ejemplo, haciendo fluir una segunda corriente en la cámara a través de la salida en una dirección que es paralela a la dirección de la $F_{\text{centrífuga}}$.

También se divulgan en este documento métodos de detección de biomoléculas cristalinas y/o biomoléculas amorfas en una muestra. En realizaciones ejemplares, el método comprende obtener una pluralidad de espectros de RMN de ^1H de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) de la muestra, y obtener espectros de RMN de ^{13}C de polarización cruzada (CP) de la muestra.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico del perfil de pH de salida para kSep® y una centrífuga tradicional.

La figura 2 es un diagrama de flujo del proceso de cristalización de proteínas con el dispositivo kSep®.

La figura 3 es una imagen de una interfaz de usuario gráfica de concentrado-lavado-recolección kSep® (CWH).

La figura 4 es un diagrama/dibujo de las tuberías e instrumentación del sistema kSep® para la evaluación de la recolección.

La figura 5 es un espectro de RMN de ^1H CPMG de material cristalino (rojo) frente a amorfo (azul).

La figura 6 es un espectro de RMN de ^1H CPMG de diversas preparaciones de material cristalino mostrando entre un 100 % y un 0 % la posibilidad de cuantificación. Las preparaciones A, B y C contienen cantidades decrecientes de cristales. "Un 5 % amorfo" es una preparación que contiene cristales con un 5 % de material amorfo y "un 5 % de cristales" es una preparación que contiene material amorfo con un 5 % de cristales.

La figura 7 es un espectro de RMN de ^1H CPMG frente a la temperatura que muestra que la intensidad de los picos aumenta con la temperatura, lo que indica que la movilidad está aumentando.

Descripción detallada

En este documento se divulgan métodos dirigidos a biomoléculas cristalinas. Se proporcionan métodos para preparar una composición que comprende biomoléculas cristalinas. En realizaciones ejemplares, el método comprende formar un lecho fluido de biomoléculas cristalinas en una cámara giratoria que comprende una entrada y una salida, en el que el lecho fluido se crea rotando la cámara alrededor de un eje sustancialmente horizontal para crear una fuerza centrífuga ($F_{\text{centrífuga}}$) en dicha cámara, hacer fluir una primera corriente de una primera solución a través de la entrada en una dirección opuesta a la dirección de la $F_{\text{centrífuga}}$ y a un primer caudal (FR1) que tiene una fuerza (F_{FR1}) que contraequilibra $F_{\text{centrífuga}}$, y recoger la primera solución de la cámara mientras se mantiene sustancialmente la formación del lecho fluido de biomoléculas cristalizadas.

En realizaciones ejemplares, el método comprende una etapa de intercambio de tampón, una etapa de concentración o tanto una etapa de intercambio de tampón como una etapa de concentración. A continuación, se proporciona descripción adicional de cada etapa.

Etapa de intercambio de tampón

En realizaciones ejemplares, el método comprende una etapa de intercambio de tampón y, en aspectos ejemplares, dicha etapa se produce mientras se mantiene el lecho fluido de biomoléculas cristalinas. En aspectos ejemplares, el método comprende reemplazar la primera corriente de la primera solución con una segunda corriente de una segunda solución mientras se mantiene sustancialmente la formación del lecho fluido de biomoléculas cristalizadas. En aspectos ejemplares, el método comprende hacer fluir una segunda corriente de una segunda solución para reemplazar la primera corriente de la primera solución mientras se mantiene sustancialmente la formación del lecho fluido de biomoléculas cristalizadas.

5 En aspectos ejemplares, el método comprende hacer fluir una segunda corriente o una segunda solución a través de la entrada en una dirección opuesta a la dirección de la $F_{\text{centrífuga}}$ y a un caudal (FR) equivalente a FR1 que tiene una fuerza (F) igual a F_{FR1} , de modo que la fuerza de la segunda corriente contraequilibra $F_{\text{centrífuga}}$, y recoger la segunda solución de la cámara mientras se mantiene sustancialmente la formación del lecho fluido de biomoléculas cristalizadas. En aspectos ejemplares, $F_{\text{centrífuga}}$ es adecuada para mantener las biomoléculas cristalinas en el lecho fluido. En determinados aspectos, $F_{\text{centrífuga}}$ está en el intervalo de aproximadamente 500 g a aproximadamente 3000 g. En determinados aspectos, $F_{\text{centrífuga}}$ está en el intervalo de aproximadamente 750 g a aproximadamente 1250 g. En determinados aspectos, $F_{\text{centrífuga}}$ es aproximadamente 1000 g (± 100 g) durante esta etapa.

10 El volumen de alimentación de la segunda corriente de la segunda solución es suficiente para mantener las biomoléculas cristalinas en el lecho fluido. En aspectos ejemplares, el volumen de alimentación de la segunda corriente de la segunda solución es de aproximadamente 50 a 500 ml. En aspectos ejemplares, el volumen de alimentación de la segunda corriente de la segunda solución es de aproximadamente 100 a 300 ml. En aspectos ejemplares, el número de volúmenes de la primera solución por cámara es 2 o más. En aspectos ejemplares, FR1 es suficiente para mantener las moléculas cristalinas en el lecho fluido. En aspectos ejemplares, FR1 es de aproximadamente 50 ml/min a aproximadamente 150 ml/min. En aspectos ejemplares, FR1 es de aproximadamente 70 ml/min a aproximadamente 120 ml/min.

20 De forma ventajosa, los métodos no se limitan a un tipo particular de tampón, con la condición de que el tampón no influya negativamente en la integridad de las biomoléculas cristalinas, por ejemplo, el tampón no influye negativamente en el tamaño, forma y/o calidad del producto de las biomoléculas cristalinas. A este respecto, cada una de la primera solución y segunda solución puede ser cualquier tipo de tampón o solución caracterizada por cualquier pH. En aspectos ejemplares, el pH de la solución es un pH fisiológico, por ejemplo, de 6,5 a 7,5. En aspectos ejemplares, la solución puede tener un pH que es al menos 5, al menos 5,5, al menos 6, al menos 6,5, al menos 7, al menos 7,5, al menos 8, al menos 8,5, al menos 9, al menos 9,5, al menos 10 o al menos 10,5 hasta e incluyendo pH 11. En aspectos ejemplares, una o ambas de la primera solución y la segunda solución comprenden independientemente un agente tamponante. En aspectos ejemplares, el agente tamponante se selecciona del grupo que consiste en: tampones fosfato (por ejemplo, PBS), trietanolamina, Tris, bicina, TAPS, tricina, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodilato, MES, acetato, citrato, succinato, histidina u otros tampones farmacéuticamente aceptables.

30 En aspectos ejemplares, la primera solución es un tampón hipertónico de cristalización de proteínas. En aspectos ejemplares, la segunda solución es un tampón de formulación que es seguro para su administración a un mamífero, por ejemplo, un ser humano. En aspectos ejemplares, la segunda solución tiene un pH fisiológico y es estéril.

35 *Etapas de concentración*

40 En realizaciones adicionales o alternativas, el método comprende concentrar las biomoléculas cristalizadas dentro de una región de la cámara. En aspectos ejemplares, el método comprende concentrar las biomoléculas cristalizadas después de una etapa de intercambio de tampón, tal como, por ejemplo, cualquiera de las descritas en este documento. En aspectos ejemplares, la etapa de concentración se produce (i) cambiando FR1 a un segundo caudal (FR2) que tiene una fuerza (F_{FR2}) que es menor de $F_{\text{centrífuga}}$ o (ii) aumentando la velocidad de rotación de la cámara para aumentar $F_{\text{centrífuga}}$ hasta un nivel que es mayor que F_{FR1} , o (iii) tanto (i) como (ii). En aspectos ejemplares, $F_{\text{centrífuga}}$ es 1000 g durante al menos esta etapa. En aspectos ejemplares, el volumen de alimentación de la segunda corriente de la segunda solución es de aproximadamente 100 a 500 ml. En aspectos ejemplares, el volumen de alimentación de la segunda corriente de la segunda solución es de aproximadamente 150 ml a aproximadamente 350 ml, por ejemplo, aproximadamente 150 ml, aproximadamente 200 ml, aproximadamente 250 ml, aproximadamente 300 ml o aproximadamente 350 ml. En aspectos ejemplares, el número de volúmenes de la primera solución por cámara es 1. En aspectos ejemplares, FR2 es de aproximadamente 10 ml/min a aproximadamente 50 ml/min. En aspectos ejemplares, FR2 es menor de aproximadamente 60 ml/min. En aspectos ejemplares, FR2 es de aproximadamente 10 ml/min a aproximadamente 50 ml/min. En aspectos ejemplares, FR2 es de aproximadamente 20 ml/min a aproximadamente 40 ml/min. En aspectos ejemplares, FR2 es aproximadamente 20 ml/min, aproximadamente 25 ml/min, aproximadamente 30 ml/min, aproximadamente 35 ml/min o aproximadamente 40 ml/min.

55 En aspectos ejemplares, después de la etapa de concentración, la concentración de las biomoléculas cristalinas está aumentada al menos 2 veces, al menos 3 veces o al menos 4 veces.

Etapas de recolección

60 En aspectos ejemplares, el método comprende retirar las biomoléculas cristalinas de la cámara. En aspectos ejemplares, el método comprende retirar las biomoléculas cristalinas de la cámara después de concentrar las biomoléculas cristalinas dentro de una región de la cámara. En aspectos ejemplares, el método comprende retirar una suspensión concentrada de las biomoléculas cristalinas de la cámara lentamente sin alterar la suspensión de cristales compactada y/o sin provocar cavitación dentro de la suspensión de cristales compactada. La cavitación dentro de la suspensión de cristales compactada es indeseable ya que altera el perfil de concentración y crea un gradiente de concentración no uniforme a través de la suspensión de cristales concentrada.

En aspectos ejemplares, el método comprende hacer fluir una segunda corriente en la cámara a través de la salida en una dirección que es paralela a la dirección de la $F_{\text{centrífuga}}$ para retirar las biomoléculas cristalinas de la cámara.

5 En aspectos ejemplares, el método comprende disminuir $F_{\text{centrífuga}}$ hasta un nivel de aproximadamente 5 g a aproximadamente 20 g o hasta un nivel de aproximadamente 5 g a aproximadamente 15 g. En aspectos ejemplares, $F_{\text{centrífuga}}$ se disminuye hasta por debajo de aproximadamente 10 g, por ejemplo, aproximadamente 8 g.

10 En aspectos ejemplares, FR1 se controla mediante una primera bomba y la primera bomba se establece a aproximadamente 10 ml/min a aproximadamente 100 ml/min después de la etapa de intercambio de tampón y/o concentración. En aspectos ejemplares, FR1 se controla mediante una primera bomba y la primera bomba se establece a menos de aproximadamente 75 ml/min. En aspectos ejemplares, FR1 se controla mediante una primera bomba y la primera bomba se establece a aproximadamente 15 ml/min a aproximadamente 65 ml/min después de la etapa de intercambio de tampón y/o concentración. En aspectos ejemplares, la primera bomba se establece a aproximadamente 45 ml/min a aproximadamente 65 ml/min, opcionalmente, aproximadamente 50 ml/min.

15 En aspectos ejemplares, la cámara giratoria se conecta a una bomba peristáltica de cámara. En casos ejemplares, la bomba peristáltica de cámara se bombea en la misma dirección de la primera bomba y $F_{\text{centrífuga}}$. Sin limitares a teoría particular alguna, la primera bomba actúa como un mecanismo de "extracción" que succiona el material de la cámara, mientras que la bomba peristáltica de cámara actúa como un mecanismo de "empuje" para garantizar que no hay cavitación de la biomolécula. En aspectos ejemplares, la bomba peristáltica de cámara se establece a aproximadamente 50 ml/min a aproximadamente 150 ml/min después de la etapa de intercambio de tampón y/o concentración. En aspectos ejemplares, la bomba peristáltica de cámara se establece a menos de 100 ml/min. En algunas realizaciones, la bomba peristáltica de cámara se establece a aproximadamente 60 ml/min a aproximadamente 90 ml/min. En casos ejemplares, la bomba peristáltica de cámara se establece a aproximadamente 75 ml/min, la primera bomba se establece a aproximadamente 50 ml/min y $F_{\text{centrífuga}}$ se disminuye hasta por debajo de 25 10 g, opcionalmente 8 g.

Aparato de CFGC

30 En aspectos ejemplares, los métodos divulgados se realizan en un sistema de centrifugación de gradiente a contracorriente (CFGC). En aspectos ejemplares, el aparato comprende más de una cámara giratoria. En aspectos ejemplares, el aparato comprende al menos 2, al menos 4 o al menos 6 cámaras giratorias. En aspectos ejemplares, el aparato comprende 4 o 6 cámaras. En realizaciones ejemplares, el método se realiza en un aparato que comprende más de una cámara giratoria y cada cámara puede hacerse funcionar simultáneamente con otras cámaras del aparato, o puede hacerse funcionar por sí misma. En aspectos ejemplares, las etapas del método divulgado se realizan en más de una cámara. En aspectos ejemplares, las etapas del método divulgado se realizan en dos, tres o cuatro cámaras. En aspectos ejemplares, las etapas del método divulgado se realizan en cinco o seis cámaras. En aspectos ejemplares, las etapas del método divulgado se realizan en más de aproximadamente 6, más de aproximadamente 10, más de aproximadamente 20 cámaras.

40 En aspectos ejemplares, el aparato es un sistema kSep®. En aspectos ejemplares, el aparato es un kSep@400, que tiene cuatro cámaras individuales, de las que cada una de ellas tiene una capacidad de 100 ml. En aspectos ejemplares, el aparato es un kSep@6000S, que tiene seis cámaras individuales, de las que cada una de ellas tiene una capacidad de 1000 ml. El kSep@6000S tiene un caudal máximo de 720 l/h.

45 En aspectos ejemplares, cuando el método divulgado se realiza en más de una cámara del aparato, las biomoléculas cristalinas se retiran de las cámaras una cada vez. Por ejemplo, las biomoléculas cristalinas se retiran de cada cámara de una manera secuencial. Por tanto, la retirada de biomoléculas cristalinas de una cámara del aparato se produce en un momento distinto de cuando se retiran las biomoléculas cristalinas de otra cámara del aparato. Sin limitarse a teoría particular alguna, se cree que retirar las biomoléculas cristalinas de una cámara en un momento reduce las posibilidades de cavitación de las biomoléculas cristalinas.

Realizaciones ejemplares

55 En aspectos ejemplares, el método de preparación de una composición que comprende biomoléculas cristalinas comprende (a) formar un lecho fluido de biomoléculas cristalinas en una cámara giratoria que comprende una entrada y una salida, en el que el lecho fluido se crea rotando la cámara alrededor de un eje sustancialmente horizontal para crear una fuerza centrífuga ($F_{\text{centrífuga}}$) en dicha cámara, hacer fluir una primera corriente de una primera solución a través de la entrada en una dirección opuesta a la dirección de la $F_{\text{centrífuga}}$ y a un primer caudal (FR1) que tiene una fuerza (F_{FR1}) que contraequilibra $F_{\text{centrífuga}}$, y recoger dicha primera solución de la cámara mientras se mantiene sustancialmente la formación del lecho fluido de biomoléculas cristalizadas, (b) realizar la etapa (i), etapa (ii) o etapa (iii), en el que la etapa (i) es hacer fluir una segunda corriente de una segunda solución para reemplazar la primera corriente de la primera solución mientras se mantiene sustancialmente la formación del lecho fluido de biomoléculas cristalizadas, la etapa (ii) es concentrar las biomoléculas cristalizadas dentro de una región de la cámara cambiando 60 FR1 a un segundo caudal (FR2) que tiene una fuerza (F_{FR2}) que es menor que $F_{\text{centrífuga}}$ o aumentando la velocidad de rotación de la cámara para aumentar $F_{\text{centrífuga}}$ hasta un nivel que es mayor que F_{FR1} , y la etapa (iii) es una combinación

de la etapa (i) y la etapa (ii), y (c) retirar las biomoléculas cristalinas de la cámara. En aspectos ejemplares, las biomoléculas cristalinas se retiran de la cámara haciendo fluir una segunda corriente en la cámara a través de la salida en una dirección que es paralela a la dirección de la $F_{\text{centrífuga}}$ para retirar las biomoléculas cristalinas de la cámara.

5 Etapas adicionales

Los métodos divulgados en este documento pueden comprender etapas adicionales. Por ejemplo, los métodos pueden comprender una o más etapas anteriores o etapas posteriores implicadas en producir, purificar y formular una proteína recombinante. En realizaciones ejemplares, el método comprende etapas para generar células hospedadoras que expresan una proteína recombinante (por ejemplo, anticuerpo recombinante). Las células hospedadoras pueden ser células hospedadoras procariotas, por ejemplo, *E. coli* o *Bacillus subtilis*, o las células hospedadoras pueden ser eucariotas, por ejemplo, células de levadura, células de hongos filamentosos, células de protozoos, células de insecto o células de mamífero (por ejemplo, células CHO). Dichas células hospedadoras se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Frenzel, *et al.*, *Front Immunol* 4: 217 (2013). Por ejemplo, los métodos comprenden, en algunos casos, introducir en las células hospedadoras un vector que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante, o una cadena polipeptídica de la misma.

En realizaciones ejemplares, el método comprende etapas para cultivar células hospedadoras que expresan una proteína recombinante (por ejemplo, anticuerpo recombinante). Dichas etapas son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Li *et al.*, *MAbs* 2(5): 466-477 (2010).

En realizaciones ejemplares, el método comprende etapas para purificar la proteína recombinante (por ejemplo, anticuerpo recombinante) del cultivo. En aspectos ejemplares, el método comprende una o más etapas de cromatografía, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A), cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de interacción hidrófoba. En aspectos ejemplares, el método comprende etapas para producir biomoléculas cristalinas de una solución que comprende las proteínas recombinantes. En aspectos ejemplares, el método comprende etapas para preparar material cristalino, incluyendo las descritas en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2016010927, titulada "CRYSTALLINE ANTIBODY FORMULATIONS". El método puede comprender en algunos aspectos controlar las condiciones o factores de la solución que afectan a la cristalización, por ejemplo, la tasa de evaporación del disolvente, disolventes orgánicos o aditivos, la presencia de cosolutos apropiados y tampones, pH y temperatura. Se ha publicado una revisión exhaustiva de los diversos factores que afectan a la cristalización de las proteínas por McPherson (1985, *Methods Enzymol* 114: 112-120). Como guía, están disponibles los contenidos de McPherson y Gilliland (1988, *J Crystal Growth*, 90: 51-59) que incluyen listas exhaustivas de polipéptidos que se han cristalizado, así como las condiciones en que se cristalizan. Además, se mantiene un compendio de cristales y recetas de cristalización, así como un repositorio de coordenadas de estructuras proteínicas resueltas, por el Protein Data Bank en el Brookhaven National Laboratory (www.rcsb.org/pdb/; Bernstein *et al.*, 1977, *J Mol Biol* 112: 535-542). En general, los cristales se producen combinando el polipéptido (es decir, anticuerpo) a cristalizar con un disolvente acuoso apropiado o disolvente acuoso que contiene agentes de cristalización apropiados, tales como sales o disolventes orgánicos o aditivos (colectivamente el "reactivo de cristalización"). El disolvente se combina con el polipéptido y puede someterse a agitación a una temperatura determinada experimentalmente como apropiada para la inducción de cristalización y aceptable para el mantenimiento de la actividad y estabilidad polipeptídica. Los métodos a escala de laboratorio para la cristalización incluyen difusión de vapor por gota colgante, difusión de vapor por gota posada, microdiálisis, métodos de retirada microdiscontinuos, en aceite, en gel y emparedados. El disolvente puede incluir opcionalmente aditivos de cocrystalización, tales como precipitantes, ácidos grasos, agentes reductores, glicerol, sulfobetaína, tensioactivos, polioles, cationes divalentes, cofactores o caótopos, y aminoácidos, así como especies de tampones para controlar el pH. Los "aditivos de cocrystalización" incluyen compuestos que facilitan la cristalización de un polipéptido y/o compuestos que estabilizan la proteína y protegen contra la desnaturalización. Ejemplos de cosolutos incluyen acetato de amonio, cloruro de amonio, fluoruro de amonio, formiato de amonio, nitrato de amonio, fosfato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de cadmio, sulfato de cadmio, acetato de calcio, cloruro de calcio, cloruro de cesio, cloruro cobaltoso, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$ · (CTAB), citrato de diamonio, hidrogenofosfato de diamonio, fosfato de diamonio, tartrato de diamonio, fosfato de dipotasio, fosfato de disodio, tartrato de disodio, ácido DL-málico, cloruro férrico, L-prolina, acetato de litio, cloruro de litio, nitrato de litio, sulfato de litio, acetato de magnesio, cloruro de magnesio, formiato de magnesio, nitrato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de níquel, acetato de potasio, bromuro de potasio, cloruro de potasio, citrato de potasio, fluoruro de potasio, formiato de potasio, nitrato de potasio, fosfato de potasio, tartrato de potasio y sodio, sulfato de potasio, tiocianato potasio, acetato de sodio, bromuro de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, fluoruro de sodio, formiato de sodio, malonato de sodio, nitrato de sodio, fosfato de sodio, sulfato de sodio, tiocianato de sodio, ácido succínico, tacsimato, citrato de triamonio, citrato de trilitio, N-óxido de trimetilamina, citrato de tripotasio, citrato de trisodio, acetato de cinc, sulfato de cinc y otros compuestos que funcionan aportando cosolutos. La "cristalización" incluye compuestos que mantienen el pH de una solución en un intervalo deseado para facilitar la cristalización de un polipéptido. Ejemplos incluyen ACES (ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico), BES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), Bicina (N,N-Bis(2-hidroxietil)glicina), BIS-TRIS (2,2-bis-(hidroximetil)-2,2',2"-nitrilotrietanol), ácido bórico, CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico), ácido cítrico, EPPS (HEPPS, ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-propanosulfónico), Gly-Gly ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$, glicil-glicina), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico), imidazol, MES (ácido 2-morfolinoetanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico), PIPES (ácido piperazin-1,4-bis(2-

5 etanosulfónico)), cloruro de potasio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, fosfato de sodio monobásico (dihidrogenofosfato de sodio), fosfato de sodio dibásico, TAPS (ácido N-[tris-(hidroximetil)metil]-3-aminopropanosulfónico), TAPSO (ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-3-amino-2-hidroxiopropanosulfónico), TES (ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico), Tricina (N-[tris(hidroximetil)metil]glicina), Tris-HCl, TRIZMA (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol) y otros compuestos que funcionan manteniendo una solución en o cerca de un pH especificado.

10 La selección de precipitantes es un factor que afecta a la cristalización. Por ejemplo, pueden usarse productos de PEG, por ejemplo, de peso molecular 200 a 20 000 kDa. PEG3350 es un precipitante o deshidratante polimérico largo que funciona mediante un efecto de exclusión de volumen. Las sales liótropas, tales como sulfato de amonio, promueven los procesos de precipitación, como lo hacen los ácidos grasos de cadena corta, tal como ácido caprílico. Las especies poliiónicas también son precipitantes útiles.

15 Los anticuerpos para su uso en formulaciones para inyección subcutánea, por ejemplo, preferiblemente se precipitan a un intervalo de pH fisiológico y en un reactivo de cristalización que proporciona osmolalidad isotónica. La necesidad de aditivos, cosolutos, tampones, etc. y sus concentraciones se determinan experimentalmente para facilitar la cristalización.

20 En un proceso a escala industrial, la precipitación controlada que da lugar a cristalización puede realizarse mejor mediante la combinación simple de polipéptido, precipitante, cosolutos y, opcionalmente, tampones en un proceso discontinuo. Como otra opción, los polipéptidos pueden cristalizarse usando precipitados polipeptídicos como material de partida ("inóculo"). En este caso, los precipitados polipeptídicos se añaden a una solución de cristalización y se incuban hasta que se forman cristales.

25 También pueden adoptarse métodos de cristalización de laboratorio alternativos, tales como diálisis o difusión de vapor. McPherson, *supra* y Gilliland, *supra*, incluyen una lista exhaustiva de condiciones adecuadas en sus revisiones de la bibliografía de cristalización. Ocasionalmente, en casos en que el polipéptido cristalizado tiene que reticularse, la incompatibilidad entre un agente de reticulación pretendido y el medio de cristalización podría requerir el intercambio de los cristales a un sistema disolvente más adecuado.

30 De acuerdo con algunas realizaciones, los cristales polipeptídicos, las formulaciones de cristales y las composiciones se preparan mediante el siguiente proceso: en primer lugar, se cristaliza el polipéptido. A continuación, se añaden excipientes o ingredientes como se describen en este documento directamente a las aguas madre. Como alternativa, los cristales se suspenden en una solución de excipiente u otros ingredientes de formulación, después de retirar las aguas madre, durante un mínimo de 1 hora a un máximo de 24 horas. La concentración de excipiente es típicamente entre aproximadamente un 0,01 y un 30 % p/p, que corresponde a una concentración de cristales polipeptídicos de un 99,99 a un 70 % p/p, respectivamente. En una realización, la concentración de excipiente es entre aproximadamente un 0,1 y un 10 %, que corresponde a una concentración de cristales de un 99,9 a un 90 % p/p, respectivamente. Las aguas madre pueden retirarse de la suspensión de cristales por filtración, intercambio de tampón o por centrifugación.

35 40 Posteriormente, los cristales se lavan con un vehículo inyectables isotónico siempre que estos vehículos no disuelvan los cristales, opcionalmente con soluciones de un 50 a un 100 % de uno o más disolventes orgánicos o aditivos tales como, por ejemplo, etanol, metanol, isopropanol o acetato de etilo, o polietilenglicol (PEG), a temperatura ambiente o a temperaturas entre -20 °C y 25 °C. Además, puede usarse agua para lavar los cristales. Los cristales se secan pasando una corriente de nitrógeno, aire o gas inerte sobre los cristales. Finalmente, puede realizarse micronización de los cristales si fuera necesario. El secado de los cristales polipeptídicos es la retirada de agua, disolvente orgánico o aditivo, o polímero líquido por un medio que incluye seca con N₂, aire o gases inertes; secado en horno de vacío; liofilización; lavado con un disolvente orgánico volátil o aditivo seguido de evaporación del disolvente; o evaporación en una campana de flujo laminar. Típicamente, el secado se consigue cuando los cristales se convierten en un polvo de flujo libre. El secado puede realizarse pasando una corriente de gas sobre cristales húmedos. El gas puede seleccionarse del grupo que consiste en: nitrógeno, argón, helio, dióxido de carbono, aire o combinaciones de los mismos. El diámetro de las partículas conseguido puede estar en el intervalo de 0,1 a 100 micrómetros, o en el intervalo de 0,2 a 10 micrómetros, o en el intervalo de 10 a 50 micrómetros, o en el intervalo de 0,5 a 2 micrómetros. Para formulaciones a administrar por inhalación, en una realización las partículas formadas a partir de cristales polipeptídicos están en el intervalo de 0,5 a 1 micrómetros.

45 50 55 De acuerdo con algunas realizaciones, cuando se preparan cristales proteínicos, formulaciones o composiciones de cristales proteínicos, no se añaden potenciadores, tales como tensioactivos durante la cristalización. De acuerdo con algunas otras realizaciones, cuando se preparan cristales proteínicos, formulaciones o composiciones de cristales proteínicos, se añaden potenciadores, tales como tensioactivos durante la cristalización. Se añaden excipientes o ingredientes a las aguas madre después de cristalización, a una concentración entre aproximadamente un 1-10 % p/p, como alternativa a una concentración entre aproximadamente 0,1-25 % p/p, como alternativa a una concentración entre aproximadamente un 0,1-50 % p/p. Estas concentraciones corresponden a concentraciones de cristales de un 99-90 % p/p, 99,9-75 % p/p y 99,9-50 % p/p, respectivamente. El excipiente o ingrediente se incubaba con los cristales en las aguas madre durante aproximadamente 0,1-3 h, como alternativa la incubación se realiza durante 0,1-12 h, como alternativa la incubación se realiza durante 0,1-24 h.

5 En algunas realizaciones o en cualquier realización, el ingrediente o excipiente se disuelve en una solución distinta de las aguas madre, y los cristales proteínicos se retiran de las aguas madre y se suspenden en la solución de excipientes o ingredientes. En algunas realizaciones, la solución de excipientes o ingredientes (o vehículo de resuspensión) es una mezcla de excipientes o ingredientes o tensioactivos que es isotónica e inyectable. En algunas realizaciones, la solución de excipientes o ingredientes (o vehículo de resuspensión) no es una mezcla de excipientes o ingredientes o tensioactivos que sea isotónica e inyectable. Las concentraciones de ingredientes o excipientes y los tiempos de incubación son iguales a los descritos anteriormente.

10 En realizaciones ejemplares, el método comprende etapas para formular la biomolécula purificada (por ejemplo, anticuerpo). Se describen etapas ejemplares en *Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing*, eds. Jameel y Hershenson, John Wiley & Sons, Inc. (Hoboken, NJ), 2010.

15 En realizaciones ejemplares, el método comprende analizar la muestra para formas cristalinas frente a amorfas de la biomolécula. En aspectos ejemplares, el método comprende el análisis cuantitativo de la muestra.

Biomoléculas

20 Como se usa en este documento, el término "biomolécula" o "molécula biológica" se refiere a una macromolécula grande que está presente en organismos vivos o puede prepararse o metabolizarse por un organismo vivo, o se basa estructuralmente en una molécula presente en o preparada o metabolizada por organismos vivos. Las biomoléculas incluyen, aunque no se limitan a ser, polipéptidos, proteínas, polisacáridos, lípidos (por ejemplo, glucolípidos, fosfolípidos, esteroides) y polinucleótidos o ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN o ARN).

25 De acuerdo con los métodos reivindicados, la biomolécula cristalina es una proteína que comprende una o más cadenas polipeptídicas. En aspectos ejemplares, la proteína cristalina es una hormona, factor de crecimiento, citocina, un receptor de superficie celular o cualquier otro ligando natural o no natural, que se una a receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), receptor de linfocitos T (TCR), receptor de linfocitos B (BCR), CD28, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), etc.).

35 En casos ejemplares, la biomolécula es un anticuerpo o inmunoglobulina, o un fragmento de la misma, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno. Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que tiene un formato de inmunoglobulina convencional, que comprende cadenas pesadas y ligeras, y que comprende regiones variables y constantes. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser una IgG que es una estructura "con forma de Y" de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (típicamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (típicamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Un anticuerpo tiene una región variable y una región constante. En formatos de IgG, la región variable en general es de aproximadamente 100-110 o más aminoácidos, comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), es responsable principalmente del reconocimiento del antígeno, y varía sustancialmente entre otros anticuerpos que se unen a diferentes antígenos. La región constante permite que el anticuerpo reclute células y moléculas del sistema inmunitario. La región variable está hecha de las regiones N terminales de cada cadena ligera y cadena pesada, mientras que la región constante está hecha de las partes C terminales de cada una de las cadenas pesadas y ligeras. (Janeway *et al.*, "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 4.^a ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999)).

45 La estructura general y propiedades de las CDR de los anticuerpos se han descrito en la técnica. En resumen, en un armazón de anticuerpo, las CDR están incrustadas dentro de una región flanqueante en la región variable de la cadena pesada y ligera donde constituyen las regiones responsables en gran medida de la unión a y reconocimiento del antígeno. Una región variable típicamente comprende al menos tres CDR de la cadena pesada o la cadena ligera (Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; véase también Chotia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chotia *et al.*, 1989, *Nature* 342: 877-883), dentro de una región flanqueante (denominada regiones flanqueantes 1-4, FR1, FR2, FR3 y FR4, por Kabat *et al.*, 1991; véase también Chotia y Lesk, 1987, *supra*).

55 Los anticuerpos pueden comprender cualquier región constante conocida en la técnica. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. La IgG tiene varias subclases incluyendo, aunque sin limitación IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La IgM tiene subclases incluyendo, aunque sin limitación, IgM1 e IgM2. Realizaciones de la invención incluyen todas estas clases o isotipos de anticuerpos. La región constante de la cadena ligera puede ser, por ejemplo, una región constante de la cadena ligera de tipo kappa o lambda, por ejemplo, una región constante de la cadena ligera de tipo kappa o lambda humana. La región constante de la cadena pesada puede ser, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada de tipo alfa, delta, épsilon, gamma o mu, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada de tipo alfa, delta, épsilon, gamma o mu humana. Por

consiguiente, en realizaciones ejemplares, el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM incluyendo uno cualquiera de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia que es sustancialmente similar a un anticuerpo de origen natural producido por un mamífero, por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, ser humano y similares. A este respecto, el anticuerpo puede considerarse un anticuerpo de mamífero, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, anticuerpo de conejo, anticuerpo de cabra, anticuerpo de caballo, anticuerpo de pollo, anticuerpo de hámster, anticuerpo humano y similares. En determinados aspectos, la biomolécula es un anticuerpo, tal como un anticuerpo humano. En determinados aspectos, la biomolécula es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que contiene dominios de dos o más anticuerpos diferentes. Un anticuerpo quimérico puede contener, por ejemplo, los dominios constantes de una especie y los dominios variables de una segunda, o más en general, puede contener tramos de la secuencia de aminoácidos de al menos dos especies. Un anticuerpo quimérico también puede contener dominios de dos o más anticuerpos diferentes dentro de la misma especie. El término "humanizado", cuando se usa en relación a anticuerpos se refiere a anticuerpos que tienen al menos regiones CDR de una fuente no humana que se manipulan para que tengan una estructura y función inmunológica más similar a los anticuerpos humanos verdaderos que los anticuerpos de la fuente original. Por ejemplo, la humanización puede implicar el injerto de una CDR desde un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón, en un anticuerpo humano. La humanización también puede implicar sustituciones aminoacídicas seleccionadas para hacer que una secuencia no humana sea más similar a una secuencia humana.

Un anticuerpo puede escindirse en fragmentos por enzimas, tales como, por ejemplo, papaína y pepsina. La papaína escinde un anticuerpo para producir dos fragmentos Fab y un solo fragmento Fc. La pepsina escinde un anticuerpo para producir un fragmento $F(ab')_2$ y un fragmento pFc'. En aspectos ejemplares, la biomolécula puede ser un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un Fab, Fc, $F(ab')_2$ o un pFc', que retiene al menos un sitio de glucosilación.

La arquitectura de los anticuerpos se ha explotado para crear una gama creciente de formatos de anticuerpo alternativos que abarque un intervalo de peso molecular de al menos aproximadamente 12-150 kDa y tenga un intervalo de valencia (n) de monomérico (n = 1), a dimérico (n = 2) y a trimérico (n = 3) a tetramérico (n = 4) y potencialmente mayor; dichos formatos de anticuerpo alternativos se denominan en este documento "productos proteínicos de anticuerpo".

Los productos proteínicos de anticuerpo incluyen los basados en fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, scFv, Fab y VHH/VH (analizados a continuación), que retienen la completa capacidad de unión a antígeno. El fragmento más pequeño de unión a antígeno que retiene su sitio de unión a antígeno completo es el fragmento Fv, que consiste completamente en regiones variables (V). Se usa un conector peptídico de aminoácidos soluble y flexible para conectar las regiones V a un fragmento scFv (fragmento variable monocatenario) para la estabilización de la molécula, o los dominios constantes (C) se añaden a las regiones V para generar un fragmento Fab [fragmento de unión a antígeno]. Tanto los fragmentos scFv como los Fab pueden producirse fácilmente en células hospedadoras, por ejemplo, células hospedadoras procariotas. Otros productos proteínicos de anticuerpo incluyen scFv estabilizado con puente disulfuro (ds-scFv), Fab monocatenario (scFab), así como formatos de anticuerpo di- y multiméricos como dia-, tria- y tetracuerpos, o minicuerpos (miniAb) que comprenden diferentes formatos que consisten en scFv ligados a dominios de oligomerización. Los fragmentos más pequeños son VHH/VH de Ab de cadena pesada de camélido, así como Ab de un solo dominio (sdAb). El componente más básico que se usa más frecuentemente para crear formatos de anticuerpo novedosos es el fragmento de anticuerpo de dominio variable (V) monocatenario (scFv), que comprende dominios V de la cadena pesada y ligera (dominio VH y VL) ligado mediante un conector peptídico de ~15 residuos aminoacídicos. Un pepticuerpo o fusión de péptido-Fc es otro producto proteínico de anticuerpo más. La estructura de un pepticuerpo consiste en un péptido biológicamente activo injertado en un dominio Fc. Los pepticuerpos están bien descritos en la técnica. Véase, por ejemplo, Shimamoto *et al.*, mAbs 4(5): 586-591 (2012).

Otros productos proteínicos de anticuerpo incluyen un anticuerpo monocatenario (SCA); un diacuerpo; un triacuerpo; un tetracuerpo; anticuerpos biespecíficos o triespecíficos, y similares. Los anticuerpos biespecíficos pueden dividirse en cinco clases principales: BslgG, IgG agregada, fragmentos BsAb, proteínas de fusión biespecíficas y conjugados de BsAb. Véase, por ejemplo, Spiess *et al.*, Molecular Immunology 67(2) Parte A: 97-106 (2015).

En aspectos ejemplares, la biomolécula comprende uno cualquiera de estos productos proteínicos de anticuerpo. En aspectos ejemplares, la biomolécula es uno cualquiera de un scFv, Fab VHH/VH, fragmento Fv, ds-scFv, scFab, anticuerpo dimérico, anticuerpo multimérico (por ejemplo, un diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo), miniAb, pepticuerpo VHH/VH de anticuerpo de cadena pesada de camélido, sdAb, diacuerpo; un triacuerpo; un tetracuerpo; un anticuerpo biespecífico o triespecífico, BslgG, IgG agregada, fragmento BsAb, proteína de fusión biespecífica y conjugado de BsAb.

La biomolécula puede ser un producto proteínico de anticuerpo en forma monomérica, o forma polimérica, oligomérica o multimérica. En determinadas realizaciones en que el anticuerpo comprende dos o más fragmentos de regiones de unión a antígeno distintas, el anticuerpo se considera biespecífico, triespecífico o multiespecífico, o bivalente, trivalente o multivalente, dependiendo del número de epítomos distintos que se reconocen y unen por el anticuerpo.

Métodos de detección de biomoléculas cristalinas y amorfas (divulgados, y no mencionados en las reivindicaciones, pero no excluidos por las reivindicaciones)

5 Para garantizar una formulación robusta y segura, el grado de cristalinidad o desorden se controla opcionalmente durante diversas etapas de procesamiento (por ejemplo, aumento de escala del material a granel, desarrollo de la formulación, fabricación) y durante toda la vida útil de un producto farmacéutico. Las formas amorfas de sustancias farmacéuticas junto con sus consecuencias posteriores en productos farmacéuticos y sistemas biológicos están bien documentadas. Véase, por ejemplo, Shah *et al.*, J Pharm Sci 95(8): 1641 (2006). Un sólido amorfo se define habitualmente en referencia a un sólido cristalino y típicamente carece de simetría en la orientación de traslado de intervalo largo que es característica de estructuras cristalinas. La fase amorfa puede producirse en toda la partícula o en partes de la partícula, tal como la superficie de la partícula. La detección de formas amorfas de un sólido puede ser problemática, ya que el desorden puede ser demasiado pequeño para detectarlo fácilmente. Cantidades suficientemente grandes de desorden pueden provocar cambios en el rendimiento del producto, afectando, por ejemplo, a la dureza tras la compresión, la tasa de disolución potenciada, la estabilidad química reducida y la recristalización inducida por humedad durante el almacenamiento. Véase, Shah *et al.*, 2006, *supra*. Existen diversas técnicas de cuantificación para detectar formas amorfas de un sólido (con respecto a un sólido cristalino), e incluyen, por ejemplo, difracción de rayos X de polvo (PXRD), calorimetría diferencial de barrido (DSC), microcalorimetría isotérmica (IMC), calorimetría en solución (SC), espectroscopia de infrarrojos (IRR, espectroscopia de Raman con transformada de Fourier (FT)) y RMN en estado sólido (RMNss). Sin embargo, cada uno tiene una o más desventajas.

Además de los métodos de preparación de una composición que comprende biomoléculas cristalinas, en este documento se proporcionan métodos eficaces y fáciles para detectar biomoléculas cristalinas y/o biomoléculas amorfas en una muestra, que se describen en este documento, pero no se mencionan en las reivindicaciones.

25 En realizaciones ejemplares, el método de detección de biomoléculas cristalinas y/o biomoléculas amorfas en una muestra comprende realizar análisis de RMNss de alta resolución (resonancia magnética nuclear en estado sólido) en la muestra. En realizaciones ejemplares, el método comprende obtener espectros de RMNss de ^{13}C de alta resolución usando desacoplamiento de protones y giro de ángulo mágico (MAS), en el que la potenciación de la sensibilidad se consigue por polarización cruzada (CP). En aspectos ejemplares, el método de detección de biomoléculas cristalinas y/o biomoléculas amorfas en una muestra comprende obtener una pluralidad de espectros de ^1H de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) de la muestra y obtener espectros de ^{13}C de polarización cruzada (CP) de la muestra. En aspectos ejemplares, el método comprende hacer funcionar una frecuencia de resonancia de ^1H de aproximadamente 250 a aproximadamente 1000 MHz (opcionalmente, aproximadamente 500 MHz, aproximadamente 700 MHz, aproximadamente 800 MHz, aproximadamente 900 MHz). En aspectos ejemplares, el método comprende mantener la temperatura a aproximadamente 250 a 350 K, por ejemplo, aproximadamente 250 K, aproximadamente 275 K, aproximadamente 300 K, aproximadamente 325 K o aproximadamente 350 K. En aspectos ejemplares, el método comprende hacer funcionar una sonda de giro de ángulo mágico (MAS). En casos ejemplares, el método comprende hacer funcionar una sonda MAS que comprende al menos dos canales de radiofrecuencia (rf). En aspectos ejemplares, la sonda MAS se sintoniza a ^1H y ^{13}C . En determinados aspectos, la sonda MAS se hace funcionar con una frecuencia de giro de aproximadamente 2 kHz a aproximadamente 8 kHz, o de aproximadamente 3 kHz a aproximadamente 5 kHz, por ejemplo, aproximadamente 4 kHz. En algunos aspectos, el método comprende usar impulsos de 90 grados, por ejemplo, impulsos de ^1H de 90 grados de aproximadamente 2,5 μs . En algunos aspectos, los espectros de ^1H CPMG se obtienen con aproximadamente 5 a aproximadamente 100 impulsos pi (por ejemplo, aproximadamente 10 a aproximadamente 90, aproximadamente 20 a aproximadamente 80 impulsos pi) de aproximadamente 2 μs a aproximadamente 20 μs (por ejemplo, aproximadamente 5 μs , aproximadamente 10 μs , aproximadamente 15 μs , aproximadamente 20 μs) de duración. Por ejemplo, cada uno de los impulsos pi puede estar separado por 500 μs , y opcionalmente, el tiempo total de impulsos de CPMG es 10 ms. En aspectos ejemplares, el método comprende obtener una pluralidad de espectros de ^1H CPMG mientras gira a una frecuencia de hasta 5 kHz, por encima de 8 kHz o aproximadamente 14 kHz. En algunos aspectos, el tiempo de contacto de CP de ^{13}C durante la medición es de aproximadamente 100 μs a aproximadamente 10 ms, por ejemplo, aproximadamente 250 μs , aproximadamente 500 μs , aproximadamente 750 μs , aproximadamente 1 ms, aproximadamente 2 ms, aproximadamente 3 ms, aproximadamente 4 ms, aproximadamente 5 ms, aproximadamente 6 ms, aproximadamente 7 ms, aproximadamente 8 ms, aproximadamente 9 ms, aproximadamente 10 ms). En aspectos ejemplares, la medición comprendía un impulso de bloqueo de giro de RF en ^{13}C de aproximadamente 20 kHz a aproximadamente 100 kHz, por ejemplo, aproximadamente 50 kHz. En aspectos ejemplares, el impulso de rampa en ^1H es coincidente.

El método de detección en realizaciones ejemplares en algunos aspectos comprende cuantificar el contenido de biomoléculas cristalinas en la muestra. En casos ejemplares, las biomoléculas cristalinas muestran una característica espectroscópica diferente de las biomoléculas amorfas. En casos ejemplares, las biomoléculas cristalinas muestran una característica espectroscópica de mayor movilidad molecular que las biomoléculas amorfas.

Por consiguiente, en este documento se proporcionan métodos de cuantificación del contenido de biomoléculas cristalinas y/o biomoléculas amorfas en una muestra. En aspectos ejemplares, el método comprende: (A) obtener una pluralidad de espectros de RMN de ^1H de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) de la muestra, y (B) obtener espectros de RMN de ^{13}C de polarización cruzada (CP) de la muestra. El método de cuantificación del contenido divulgado en

este documento puede realizarse de acuerdo con los contenidos de la referencia a los métodos de detección de biomoléculas cristalinas y/o biomoléculas amorfas en una muestra.

5 En aspectos ejemplares de los métodos de detección o cuantificación, las biomoléculas cristalinas son birrefringentes y opcionalmente, no difractan. En aspectos ejemplares, las biomoléculas cristalinas no difractan o difractan mal a aproximadamente 1 Å a aproximadamente 2 Å. Con respecto a los métodos de detección descritos en este documento, la biomolécula es una proteína que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Otras biomoléculas incluyen, por ejemplo, un polipéptido, proteína, polisacárido, lípido (por ejemplo, glucolípido, fosfolípido, estero), polinucleótido o ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN). En realizaciones ejemplares, la biomolécula es una proteína que comprende una o más cadenas polipeptídicas. En casos ejemplares, la biomolécula es un anticuerpo o inmunoglobulina, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de la misma, incluyendo cualquiera de los descritos en este documento bajo la sección titulada "Biomoléculas". En casos ejemplares, la proteína comprende uno o más glucanos, es decir, son biomoléculas glucadas. En realizaciones ejemplares, las biomoléculas son anticuerpos glucados.

15 Los siguientes ejemplos se dan simplemente para ilustrar la presente invención y de ninguna manera limitan su alcance, que se define por el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

20 **Ejemplo 1: Intercambio de tampón de un anticuerpo monoclonal cristalino**

El sistema kSep® (Sartorius Stedim North America, Inc., Bohemia, NY) es un sistema de centrifugación de gradiente a contracorriente diseñado para el procesamiento de productos biológicos para recoger células como productos o descartar células y recoger el sobrenadante como producto durante la fabricación. Este sistema se describe en Kelly *et al.*, Biotechnol. Prog. 32(6): 1520-1530 (2016) y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2011/0207222. El sistema kSep® difiere de un sistema de centrifugación tradicional en que las fuerzas centrífugas se equilibran por fuerzas opuestas de un flujo continuo de fluidos (por ejemplo, medio, tampón), creando un sistema de lecho fluido de células o partículas dentro del aparato. Véase, Dechsiri, C. (2004). Particle transport in fluidized beds: experiments and stochastic models Groningen: s.n. En una unidad de centrifugación tradicional, se consigue un sistema de lecho compactado. El sistema kSep® también utiliza componentes de un solo uso que minimizan la necesidad de limpiar y conducen a un procesamiento aséptico a través de conexiones de junta estéril. El sistema kSep® está disponible como un sistema a escala de laboratorio o producción. El sistema kSep®400 es un sistema a escala de laboratorio que tiene la capacidad de procesar 400 ml por ciclo a un caudal máximo de 114 l/h. El sistema kSep®400 tiene cuatro cámaras individuales de 100 ml y cada cámara puede procesarse por sí mismo o simultáneamente con las otras. El sistema kSep®6000S es un sistema a escala de producción (véase la figura 1) que tiene la capacidad de procesar 6000 ml por ciclo a un caudal máximo de 720 l/h. El sistema kSep®6000S tiene seis cámaras individuales de 1000 ml y cada cámara puede procesarse por sí misma o simultáneamente con las otras.

Aunque el sistema kSep® se ha evaluado para su uso en cristalización de proteínas (McPherson, Methods 34(3): 254-265 (2004)), no se ha usado para procesamiento posterior adicional. Aquí, el sistema kSep® se usa para reemplazar un tampón hipertónico de cristalización con un tampón isotónico de formulación adecuado para administración a los pacientes, después de una operación en la unidad de cristalización de proteínas (véase, por ejemplo, la figura 2). El sistema kSep® también se usa en la concentración de la suspensión de cristalización de proteínas hasta una concentración susceptible para dosificación a los pacientes.

45 Usando el sistema kSep®, se intercambiaron el tampón de una suspensión de cristales proteínicos que comprende un anticuerpo monoclonal completamente humano cristalino con más de un 90 % de eficacia a un volumen de intercambio de tampón y más de un 99 % de eficacia a dos volúmenes de intercambio de tampón. Alterando el equilibrio de la fuerza centrífuga y la fuerza del flujo de fluido dentro del sistema kSep®, la suspensión de cristales proteínicos de anticuerpo monoclonal se concentró antes de su distribución desde la unidad kSep®. Basándose en la cantidad de cristales cargados en la unidad y la fuerza de flujo de fluido con respecto a la fuerza centrífuga, la suspensión de cristales proteínicos puede concentrarse desde 63 mg/ml hasta un intervalo de 215 a 300 mg/ml. La centrifugación en gradiente a contracorriente mediante el sistema kSep®, por lo tanto, es un medio eficaz para el intercambio de tampón del tampón de cristalización al tampón de formulación y para concentrar los cristales proteínicos hasta concentraciones que sean susceptibles de administración a los pacientes.

Materiales y métodos

60 Equipo: Se usó la unidad kSep®400 para operaciones de intercambio de tampón y concentración de la suspensión de cristales proteínicos. La unidad kSep® a escala de laboratorio proporcionó una plataforma para evaluar estas operaciones sin gastar grandes cantidades de material. Para reducir el uso de material para la evaluación, el uso de la cámara se redujo de las cuatro cámaras convencionales del sistema kSep® que usarían un mínimo de 400 ml para dos o una cámara del sistema kSep® para reducir el uso del volumen a 100-300 ml. El conjunto de tuberías deseable de concentrado-lavado-recolección, CWH, se usó para esta evaluación ya que su configuración proporcionó una vía apropiada para recoger cristales proteínicos después de las operaciones de la unidad de intercambio de tampón y concentración.

5 Materiales: Se usó un anticuerpo monoclonal completamente humanizado para esta evaluación. Al inicio de la cristalización, la formulación del anticuerpo contenía acetato de sodio 20 mM, prolina 220 mM y polisorbato 80 al 0,01 % a pH 5,0 con una concentración de 140 mg/ml. El tampón de cristalización añadido al sistema contenía fosfato de sodio 16 mM, PEG 3350 al 20 % a pH 8,4. La suspensión de cristales proteínicos final a la conclusión de la

10 operación de la unidad de cristalización consistía en aproximadamente acetato de sodio 9 mM, prolina 98 mM, polisorbato 80 al 0,004 %, fosfato de sodio 7 mM, PEG 3350 al 8,9 % a pH 6,2. La concentración de cristales fue 62,2 mg/ml.

15 Tampón de intercambio de tampón: El tampón usado para el intercambio de tampón y concentración fue un tampón isotónico que consistía en los siguientes componentes: ácido succínico 27 mM, PEG 3350 al 15 %, PS80 al 0,1 % a pH 5,2.

15 *Resultados y observaciones*

Intercambio de tampón

20 La operación de intercambio de tampón se realizó usando el tipo de aplicación preprogramada de concentrado-lavado-recolección del sistema kSep® (véase, por ejemplo, la figura 3). Los parámetros cruciales que afectaron en el intercambio de tampón global fueron el caudal de lavado y el número de volúmenes por cámara (equivalente a diavolúmenes). El parámetro de caudal de lavado afectó tanto al tiempo de procesamiento como a la eficacia de intercambio de tampón. Cuanto mayor sea el caudal de lavado, más corto será el tiempo de procesamiento, pero mejor la eficacia de intercambio de tampón. A la inversa, un menor caudal de lavado aumentaba el tiempo de procesamiento, pero mejoraba la eficacia de intercambio de tampón. Para el número de volúmenes por cámara, los volúmenes se

25 definieron por el volumen de biorreactor especificado en el protocolo recomendado del sistema kSep®. Para cuantificar la eficacia de intercambio de tampón, se midió el pH de la corriente de salida para observar la convergencia del pH de salida con el pH del tampón de intercambio de tampón. El pH del material de alimentación de entrada empezó a 6,2 y el pH del tampón de intercambio de tampón fue 5,2, por lo tanto, el intercambio de tampón se consideró completo una vez el pH de salida alcanzó el pH del tampón de intercambio de tampón.

30 Los resultados de los experimentos de intercambio de tampón se resumen en la tabla 1. Aumentar el número de volúmenes por cámara mejoró la eficacia de intercambio de tampón ya que el pH de salida del experimento 1 fue 5,34 y el pH de salida del experimento 4 fue 5,22. Las otras variables, tales como caudal de lavado y volumen de alimentación también afectaron en el pH de salida final, pero no en la misma medida que el número de volúmenes por

35 cámara.

Tabla 1: Experimentos de intercambio de tampón para evaluar los parámetros clave de funcionamiento

Experimento	Volumen de alimentación (ml)	Caudal de lavado 1 (ml/min)	Fuerza de centrifugación (g)	n.º de (volúmenes)/ cámara	pH de alimentación de entrada	pH de salida	pH de tampón de intercambio de tampón
1	100	120	1000	1	6,2	5,34	5,2
2	100	70	1000	1	6,2	5,38	5,2
3	300	120	1000	1	6,2	5,38	5,2
4	100	120	1000	2	6,2	5,22	5,2
5	200	120	1000	2	6,2	5,27	5,2

40 El sistema kSep® funcionó mejor en términos de eficacia de intercambio de tampón en comparación con una centrífuga de mesa tradicional como se muestra en la figura 2. Después de una sola operación de giro y decantación para la centrífuga de mesa (equivalente a un número de volúmenes por cámara en el sistema kSep®), el pH de salida para la centrífuga tradicional fue 5,7 frente a aproximadamente 5,3 para el sistema kSep®. Se evaluaron volúmenes de alimentación de 100 a 300 ml, caudales de lavado 1 de 70 a 120 ml/min y volúmenes de intercambio de tampón de 1 a 2 y se determinó el grado al que se producía intercambio de tampón completo.

45

Concentrado

50 Después de la operación de intercambio de tampón, la suspensión de cristales proteínicos se concentró alterando el equilibrio entre la fuerza de centrifugación y el caudal de fluido. Teniendo la fuerza de centrifugación mayor que la fuerza del caudal de fluido, los cristales proteínicos migraban hacia un extremo de la cámara del sistema kSep® y se concentraban de manera eficaz dentro de la cámara. Los métodos para conseguir este resultado incluyeron: aumentar la fuerza de centrifugación mientras se mantiene el caudal de fluido constante, disminuir el caudal de fluido mientras se mantiene la fuerza de centrifugación constante, o una combinación de las dos previas. Hubo de variables de entrada

55 que influyeron en la variable de concentración de salida: caudal de lavado/fuerza de centrifugación y volumen de alimentación. Usando la función de caudal de lavado 2 con el programa de concentrado-lavado-recolección del sistema

kSep® (véase, por ejemplo, la figura 3), se evaluaron volúmenes de alimentación de 150 a 300 ml y caudales de lavado 2 de 20 a 35 ml/min. Basándose en esas variables de entrada, se consiguieron concentraciones que varían de 168 a 303 mg/ml usando el kSep® como se muestra en la tabla 2.

5 Tabla 2: Experimentos de concentración para evaluar parámetros clave de funcionamiento

Experimento	Volumen de alimentación (ml)	Caudal de lavado 2 (ml/min)	Fuerza de centrifugación (g)	n.º de (volúmenes)/ cámara	Concentración de salida (mg/ ml)
1	300	35	1000	1	303
2	200	35	1000	1	215
3	200	20	1000	1	235
4	200	35	1000	1	168
5	150	20	1000	1	201

10 Experimentos previos concentraron la suspensión de cristales proteínicos a concentraciones de salida que variaban de 122 a 229 mg/ml alterando el volumen de alimentación de 260 a 500 ml y manteniendo el caudal de lavado 2 a 30 ml/min. Aunque se observaron concentraciones de salida de más de 200 mg/ml, también se observó aglomeración de los cristales proteínicos y degradación de la cristalinidad mediante microscopio con capacidad de birrefringencia debido al uso de un tampón diferente de intercambio de tampón (NaPO4 10 mM pH 6,2, PEG3350 al 10 %, lisina 120 mM, tampón Ps80 al 0,1 % (lisina)). Los resultados de los experimentos fracasados iniciales se muestran en la tabla 3.

15

Tabla 3: Resultados de los experimentos iniciales

Experimento	Volumen de alimentación (ml)	Caudal de lavado 2 (ml/min)	Fuerza de centrifugación (g)	n.º de (volúmenes)/ cámara	Concentración de salida (mg/ ml)
1	500	30	1000	0,6	215
2	400	30	1000	0,6	178
3	120	30	1000	1,5	129
4	270	30	1000	0,6	122
5	300	N/A	1000	N/A	229
6	300	N/A	1000	N/A	202

Recolección

20

Después de concentrar la suspensión de cristales proteínicos hasta la concentración deseada, la suspensión debe distribuirse (recogerse) de la unidad kSep®. Típicamente, para retirar material del sistema kSep®, la unidad se procesa en modo inverso y empuja el material a través de la entrada de la cámara de kSep®. Las bombas peristálticas de cámara individuales bombean en modo inverso para retirar el material mientras la bomba de tampón realiza impulsos en el tampón para evitar grandes diferenciales de presión de la entrada y la salida. La operación de recolección preprogramada en la aplicación de concentrado-lavado-recolección de kSep® se diseña para recoger suspensiones no concentradas de la unidad y como resultado de un número de experimentos iniciales fracasados porque el material obstruía los tubos desechables en la unidad o la suspensión de cristales compactada se interrumpía desde la bomba de tampón de impulsos o la bomba peristáltica de cámara individual.

25

30

Los experimentos iniciales usaron la operación de recolección preprogramada con una velocidad de centrifugación a 60 g y un caudal de recolección (es decir, bomba peristáltica de cámara) a 50 ml/min. Usando las operaciones preprogramadas se produjeron varios fallos en los que el material no pudo recogerse de la cámara. Después de varios intentos fallidos al usar las fórmulas preprogramadas, las operaciones de recolección se cambiaron a control manual para manipular los caudales y la colocación de la válvula en una base en tiempo real. La velocidad de centrifugación se disminuyó y se mantuvo a un valor constante para reducir el número de condiciones a evaluar y la bomba de tampón se mantuvo activa en lugar de impulsando tampón. La bomba de tampón se mantuvo activa de modo que hubiera un aumento constante en la presión desde el caudal del tampón. El aumento en la presión impulsaría gradualmente la suspensión de cristales compactada desde la cámara mientras que las bombas peristálticas de cámara individuales extraerían lentamente el material del cristal y evitarían la cavitación de la suspensión de cristales compactada. La interrupción de la suspensión de cristales compactada influiría negativamente en la concentración final de cristales. La tabla 4 resumen experimentos que se refieren a recoger suspensión de cristales compactada (concentrada) desde el sistema kSep®. La tabla 4 documenta algunos de los experimentos de recolección y las observaciones anotadas durante el experimento. La suspensión de cristales compactada no pudo recogerse con la automatización de recolección preprogramada según está configurada actualmente. La operación de recolección tiene que cambiarse a una operación manual en que el experimentador pueda ajustar las configuraciones en una base en tiempo real en lugar de depender de controles automatizados. Los experimentos que se indican con una "a" y "b" son parte del mismo experimento donde las condiciones se ajustaron después de un intento de recolección fallido.

35

40

45

Tabla 4

Expt.	Programa	Velocidad de centrifugación (g)	Caudal de bomba de cámara (ml/min)	Caudal de bomba de tampón (ml/min)	N.º de cámaras en uso	Observación
1	Automatización de recolección	60	50	N/A - controlado por automatización	1	Material obstruido en la cámara
2a	Automatización de recolección	80	50	N/A - controlado por automatización	1	Material obstruido en la cámara
2b	Intervención manual	8	75	25	1	Material retirado de la cámara de kSep
3a	Intervención manual	8	75	25	1	Material obstruido en la cámara
3b	Intervención manual	8	75	50	1	Material retirado de la cámara de kSep
4	Intervención manual	8	75	50	2	Recolección no uniforme de las cámaras
5	Intervención manual	8	75	25	3	Interrupción de la suspensión de cristales compactada durante la recolección
6	Intervención manual	8	75	25	1	Material retirado de la cámara de kSep
7	Intervención manual	8	75	25	1	Material retirado de la cámara de kSep
8	Intervención manual	8	75	25	1	Material retirado de la cámara de kSep

- 5 Otro factor a considerar es las bombas de cámara individuales; las bombas de cámara individuales tienen que extraer el material de la cámara sin provocar nada de cavitación dentro de la suspensión de cristales compactada. La cavitación altera el perfil de concentración y crea un gradiente de concentración no uniforme a través de la suspensión de cristales concentrada como se documenta en los experimentos 4 y 5 de la tabla 4. Para recoger la suspensión de cristales concentrada, se recogió una cámara cada vez. Recoger múltiples cámaras de una vez aumentó la probabilidad de cavitación. La fuerza de centrifugación se mantuvo a 8 g, la bomba de tampón se estableció a 25-50 ml/min y la bomba de cámara individual se estableció a 75 ml/min (figura 4). La fuerza de centrifugación y la bomba de tampón crean la fuerza motriz para empujar el material desde la cámara mientras la bomba de cámara individual actúa como un mecanismo de extracción para garantizar que se limita la cavitación.

15 **Ejemplo 2: Distinción**

Lavado de muestras en tampón de formulación: Se prepararon muestras de material cristalino en un método discontinuo como se describe esencialmente en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2016010927, titulada "CRYSTALLINE ANTIBODY FORMULATIONS".

- 20 Todas las muestras se lavaron en un tampón de formulación de ácido succínico 27 mM y PEG 3350 al 15 % y Tw-80 al 0,1 %, pH = 5,5. Se combinó un ml de los cristales o material amorfo con 1 ml de tampón de formulación en un tubo Eppendorf y se mezcló por inversión suave. La mezcla entonces se centrifugó durante 5 min a 2000 RPM = 376 rcf y se retiró el sobrenadante. Se añadió otro 1 ml de tampón de formulación y el sedimento se resuspendió y se mezcló suavemente seguido de centrifugación. Esto se repitió una vez.

Compactación de la muestra: Todas las muestras se compactaron en rotores Bruker de 4,0 mm. Se cortó una punta de pipeta de 1 ml para que actuara como embudo en el rotor y se dimensionó de modo que el rotor y el embudo ajustaran dentro de un tubo Eppendorf de 2,0 ml. Las muestras se compactaron añadiendo 100 µl de la suspensión al

embudo y después centrifugaron a 10 000 rcf durante 2 min. Esto se repitió 4-8 veces hasta que el rotor quedó bien compactado con muestra sólida.

5 RMNs: Se usó un espectrómetro de orificio ancho Bruker Ascend Avance III que funciona a frecuencia de resonancia de ^1H de 500 MHz para el análisis. Se usó una sonda de H/F/X MAS de 4 mm que funciona a una frecuencia de giro de 4 kHz para todos los experimentos, excepto cuando se indica de otro modo. Se usó una unidad de temperatura BCU II -80/60 para controlar la temperatura a 300 K, excepto cuando se hacen estudios de temperatura. Se usaron ^1H $2,5 \text{ us } \pi/2 = 160 \text{ W}$ para impulsos de 90 grados. Los espectros de ^1H CPMG se recogieron con 20 impulsos π de 5 μs separados por 500 μs durante un total de 10 ms de impulsos CPMG que suprimen las señales del material sólido.

10 Después de medir los espectros CPMG, las muestras se centrifugaron a 14 kHz y se midió una polarización cruzada (CP) de ^{13}C como una manera de calibrar el material sólido total en el rotor y justificar las diferencias en la compactación entre muestras y rotores. Los espectros CP usaron un tiempo de contacto de 2 ms e impulso de bloqueo de giro de RF de 50 kHz en ^{13}C e impulso de rampa aproximadamente coincidente sobre ^1H .

15 Observaciones

Los espectros CPMG se usaron para suprimir las señales de protones que surgen de partes de la muestra que están en estado sólido y no móviles. En los espectros CPMG de los cristales de mAb y producto amorfo, hubo algunas señales que aparecieron en el material cristalino que no aparecieron en el material amorfo (véase la figura 5). Estas señales pudieron usarse para cuantificar la cantidad de contenido cristalino como se muestra con los espectros de muestras a las que se añadieron mAb cristalinos al 5 % o amorfos al 5 % (figura 6). Las señales en los espectros cristalinos también aumentaron con el aumento de la temperatura, lo que indica que esas partes de la molécula estaban llegando a ser más móviles (figura 7).

20

25 El uso de los términos "un/o" y "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de descripción de la divulgación (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) tiene que interpretarse que cubre tanto el singular como el plural, salvo que se indique de otro modo en este documento o se contradiga claramente por el contexto. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" tienen que interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan "incluyendo, aunque sin limitación,") salvo que se indique de otro modo.

30

La enumeración de intervalos de valores en este documento pretende servir simplemente como método acertado de referirse individualmente a cada valor separado que entra dentro del intervalo y cada valor extremo, salvo que se indique de otro modo en este documento, y cada valor separado y valor extremo se incorpora en la memoria descriptiva como si se indicara individualmente en este documento.

35

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una composición que comprende biomoléculas cristalinas, en el que las biomoléculas cristalinas son proteínas que comprenden una o más cadenas polipeptídicas, comprendiendo dicho método:
- 5 a) formar un lecho fluido de biomoléculas cristalinas en una cámara giratoria, que comprende una entrada y una salida, en el que el lecho fluido se crea rotando la cámara alrededor de un eje sustancialmente horizontal para crear una fuerza centrífuga ($F_{\text{centrífuga}}$) en dicha cámara, hacer fluir una primera corriente de una primera solución a través de la entrada en una dirección opuesta a la dirección de la $F_{\text{centrífuga}}$ y a un primer caudal (FR1) que tiene una fuerza (F_{FR1}) que contraequilibra $F_{\text{centrífuga}}$, y recoger la primera solución de la cámara mientras se mantiene sustancialmente la formación del lecho fluido de biomoléculas cristalizadas;
- 10 b) realizar la (i), (ii) o (iii):
- 15 i. hacer fluir una segunda corriente de una segunda solución para remplazar la primera corriente de la primera solución mientras se mantiene sustancialmente la formación del lecho fluido de biomoléculas cristalizadas;
- ii. concentrar las biomoléculas cristalizadas dentro de una región de la cámara cambiando FR1 a un segundo caudal (FR2) que tiene una fuerza (F_{FR2}) que es menor que $F_{\text{centrífuga}}$ o aumentando la velocidad de rotación de la cámara para aumentar $F_{\text{centrífuga}}$ hasta un nivel que es mayor que F_{FR1} ;
- 20 iii. una combinación de la etapa (i) y la etapa (ii); y
- c) hacer fluir la segunda corriente en la cámara a través de la salida en una dirección que es paralela a la dirección de la $F_{\text{centrífuga}}$ para retirar las biomoléculas cristalinas de la cámara.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que $F_{\text{centrífuga}}$ es 1000 g durante al menos la etapa (i).
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el volumen de alimentación de la segunda corriente de la segunda solución es de 50 a 500 ml durante la etapa (i); opcionalmente en el que el volumen de alimentación de la segunda corriente de la segunda solución es de 100 a 300 ml.
- 30 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos uno de:
- el número de volúmenes de la primera solución por cámara es 2 o más durante la etapa (i);
- 35 FR1 es de 50 ml/min a 150 ml/min durante la etapa (i); preferiblemente en el que FR1 es de 70 ml/min a 120 ml/min;
- la primera solución es un tampón hipertónico de cristalización; y
- 40 la segunda solución es un tampón isotónico de formulación.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos uno de:
- la $F_{\text{centrífuga}}$ es 1000 g durante la etapa (ii);
- 45 el volumen de alimentación de la segunda corriente de la segunda solución es de 100 a 500 ml durante la etapa (ii); preferiblemente en el que el volumen de alimentación de la segunda corriente de la segunda solución es de aproximadamente 150 a aproximadamente 350 ml;
- 50 el número de volúmenes de la primera solución por cámara es 1 o 2 durante la etapa (ii);
- FR2 es de 10 ml/min a 50 ml/min durante la etapa (ii), preferiblemente de 20 ml/min a 40 ml/min; y
- la concentración de las biomoléculas cristalinas se aumenta al menos 2 veces.
- 55 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método se realiza en un sistema de centrifugación de gradiente a contracorriente (CFGC).
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el aparato comprende una primera bomba y una bomba peristáltica de cámara.
- 60 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que FR1 se controla mediante la primera bomba y la primera bomba se establece a 10 ml/min a 100 ml/min después de la etapa (b), preferiblemente en el que la primera bomba se establece a 15 ml/min a 65 ml/min.
- 65 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cámara giratoria se conecta a la bomba peristáltica de cámara.

- 5 10. El método de la reivindicación 9, en el que la bomba peristáltica de cámara se establece para bombear en la misma dirección de la primera bomba y $F_{\text{centrífuga}}$; opcionalmente en el que la bomba peristáltica de cámara se establece a 50 ml/min a 100 ml/min después de la etapa (b); opcionalmente en el que la bomba peristáltica de cámara se establece a 75 ml/min; y opcionalmente en el que la bomba peristáltica de cámara se establece a 75 ml/min, la primera bomba se establece a 50 ml/min y $F_{\text{centrífuga}}$ se disminuye hasta por debajo de 10 g.
- 10 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método se realiza en un aparato que comprende más de una cámara giratoria.
- 15 12. El método de la reivindicación 11, en el que el aparato comprende al menos 2, al menos 4 o al menos 6 cámaras giratorias.
13. El método de la reivindicación 11 o 12, en el que las etapas (a) a (c) se realizan en más de una cámara.
- 20 14. El método de la reivindicación 13, en el que las biomoléculas cristalinas se retiran de una cámara del aparato en un momento distinto de cuando las biomoléculas cristalinas se retiran de otra cámara del aparato.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la biomolécula es un anticuerpo.

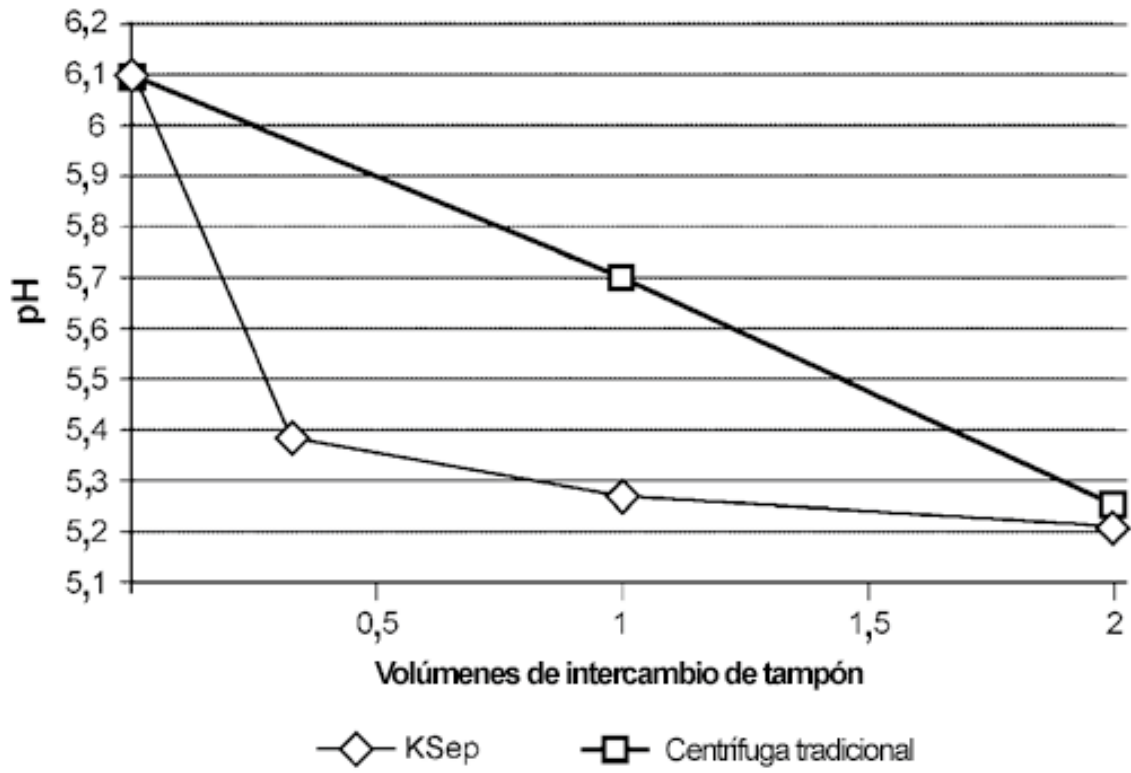


FIGURA 1

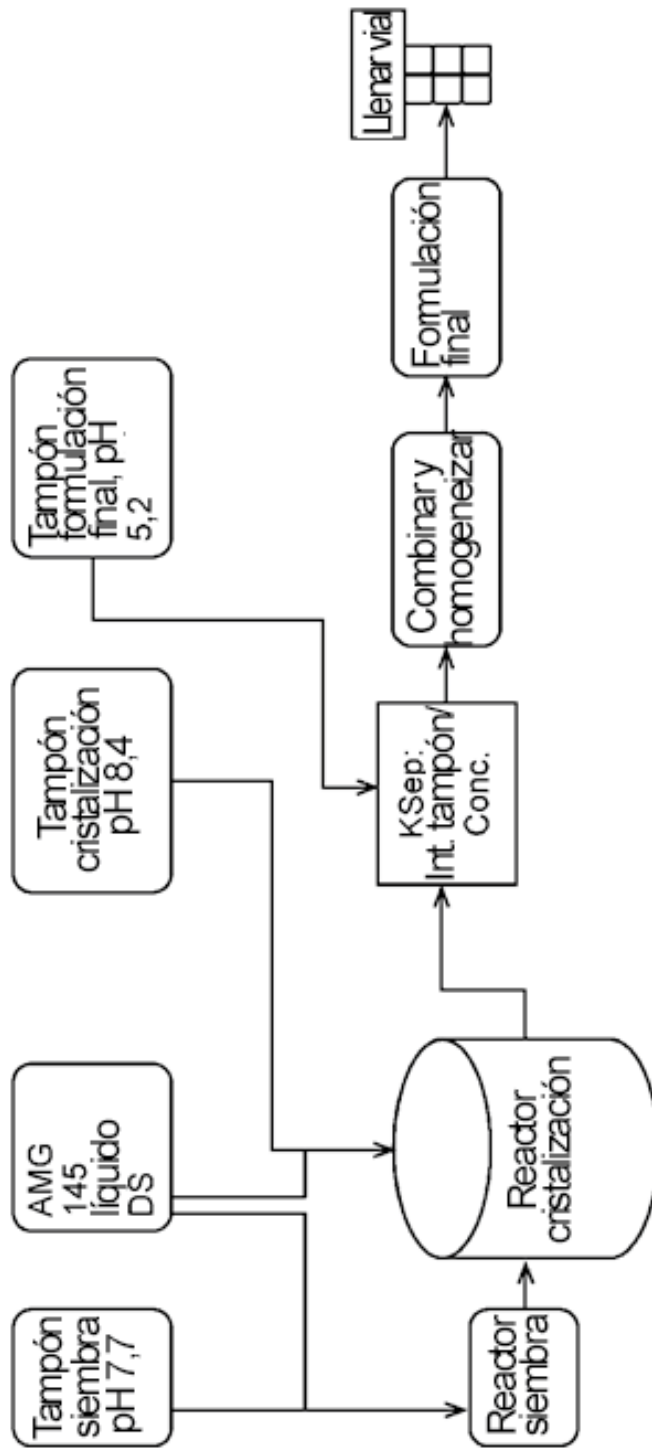


FIGURA 2

Fórmulas

Vel. mezcla y recolección: (g)

Mezclar lecho : (ml/min/c.) durante s Ciclos

Nombre fórmula:

Caudal recolección: (ml /min) / c.

Velocidad: (g) Volumen biorreactor: (l)

Volumen cebado biorreactor: (ml.)

Deshab. Volumen ciclo: (l) /c.

Lecho establ.: (ml/min)/c. durante (min)

Tiempo de rampa de caudal: (min)

Caudal normal: (ml /min) /c.

Lavado recirc.: (ml) durante (min), Ciclos

Lavado: (ml/min)/c. durante (#) /c.

2.º lavado: (ml/min)/c. durante: (#) /c.

Recipientes activos **A B C D**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Cálculos de volumen de ciclo

Densidad cel. biorreactor: millón de células/ml

Diámetro celular: um

Capacidad cámara: ml millones de cél.

Llenado: %

Lavado 1 usado para intercambio tampón ne: l / c.

es: Ciclos

Estimaciones act.

Lavado 2 usado para concentración ne: Ciclos (Redondeo)

Volumen recolección: l

Volumen residuos: l

Ajuste válvula:

FIGURA 3

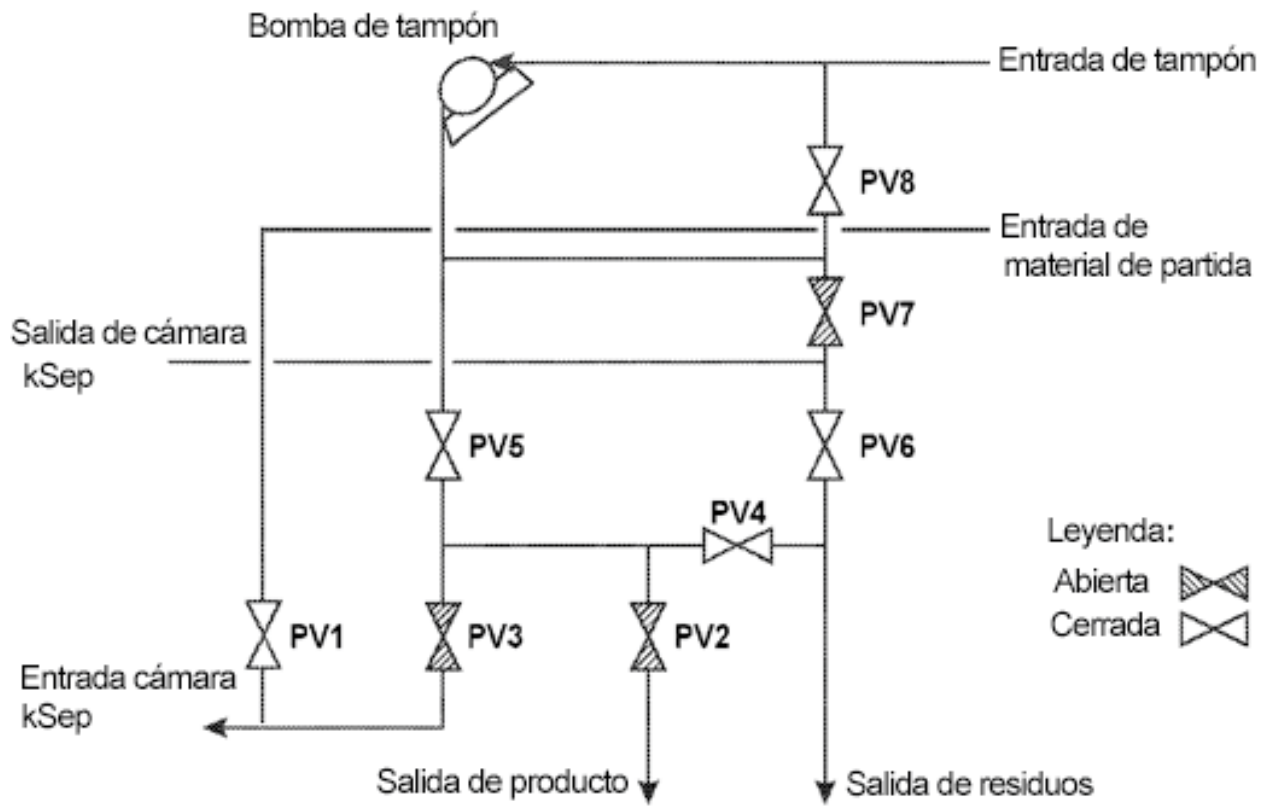


FIGURA 4

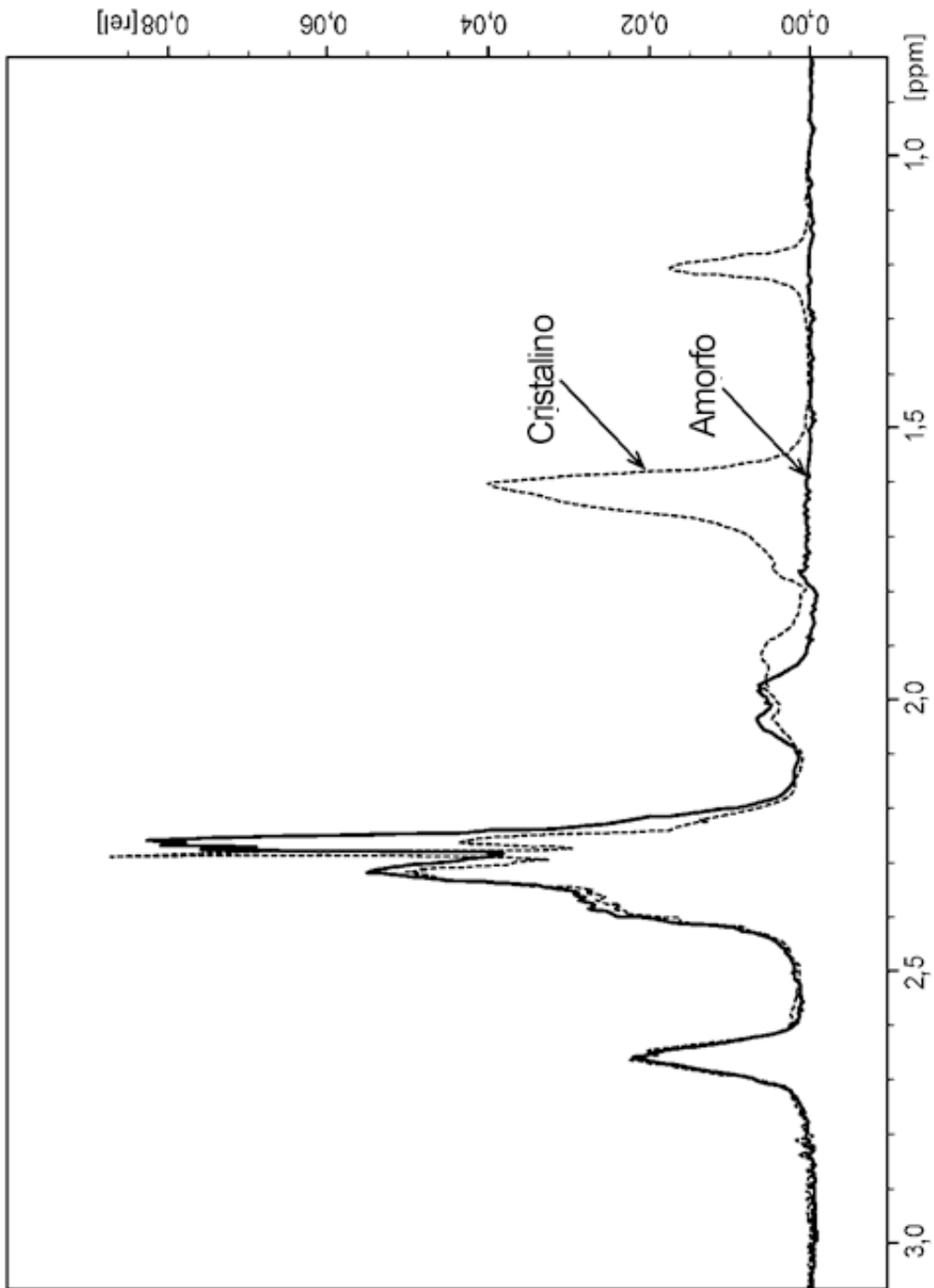


FIGURA 5

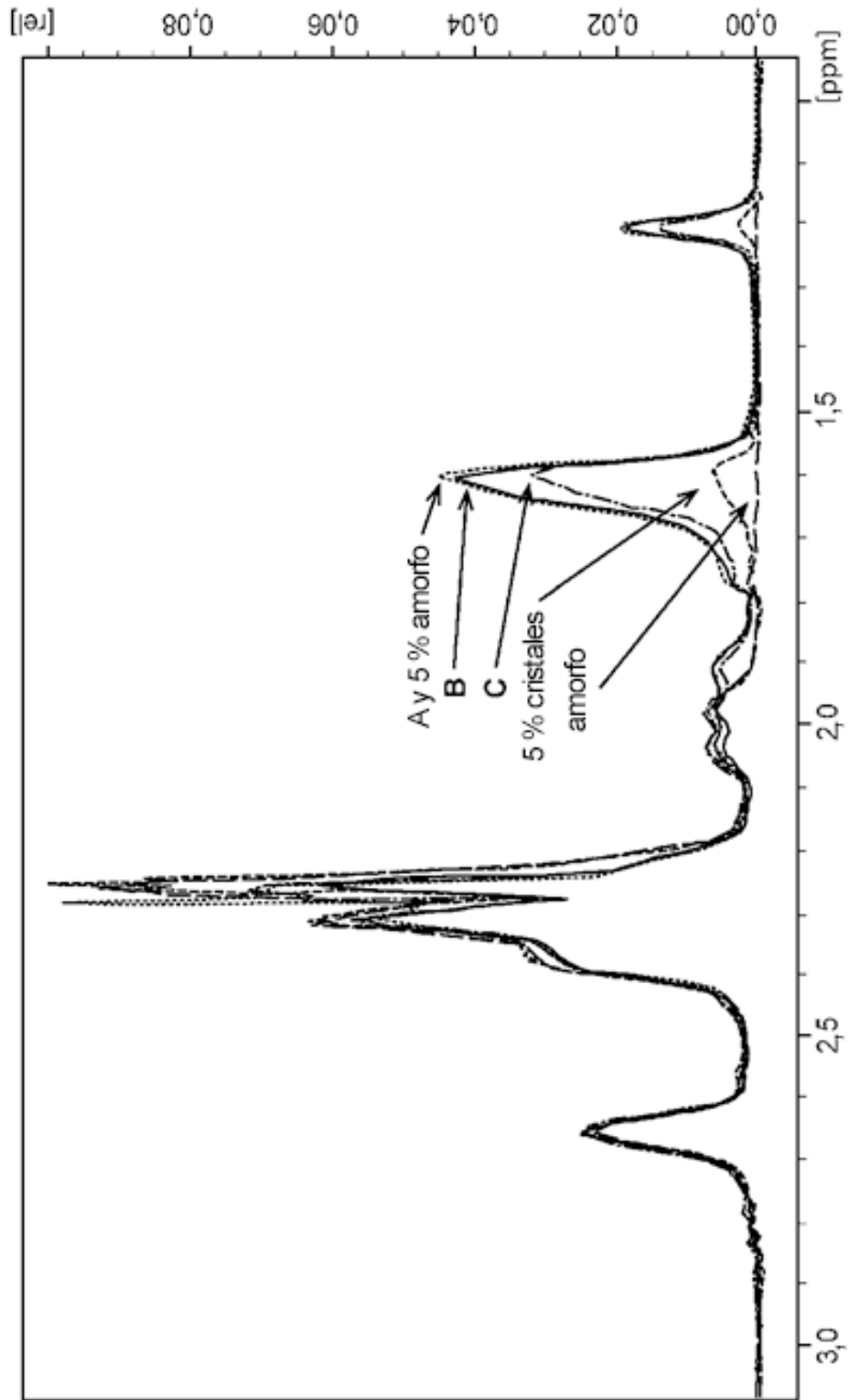


FIGURA 6

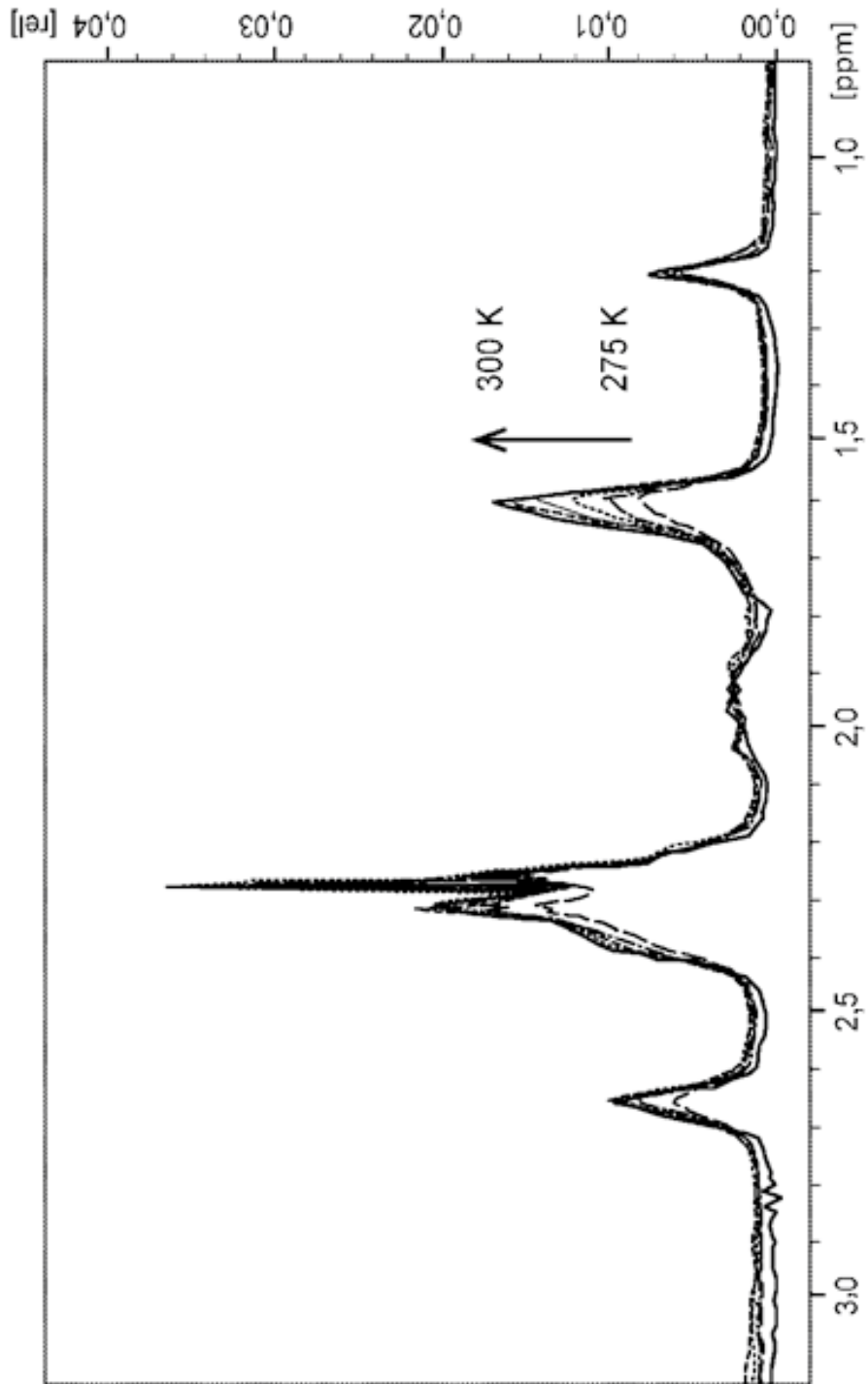


FIGURA 7