

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 820**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 1/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2008 E 08784774 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 2170949**

54 Título: **Filtración de flujo tangencial variable**

30 Prioridad:

**17.07.2007 EP 07013948**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.04.2013**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN - LA ROCHE AG (50.0%)  
124 GRENZACHERSTRASSE  
4070 BASEL 90265, CH y  
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITAT MUNCHEN  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**HEPBILDIKLER, STEFAN;  
KUHNE, WOLFGANG;  
ROSENBERG, EVA y  
WINTER, GERHARD**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 401 820 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

Filtración de flujo tangencial variable

5 La presente invención se encuentra comprendida en el campo de la concentración de proteínas; más concretamente, se refiere a la utilización de la filtración de flujo tangencial (FFT) para la concentración de inmunoglobulinas.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas y especialmente las inmunoglobulinas desempeñan un papel importante en la cartera médica actual. Los sistemas de expresión para la producción de polipéptidos recombinantes son bien conocidos del estado de la técnica y han sido descritos en, por ejemplo, Marino M.H., *Biopharm.* 2:18-33, 1989; Goeddel D.V. *et al.*, *Methods Enzymol.* 185:3-7, 1990; Wurm F. y Bernard A., *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:156-159, 1999. Los polipéptidos para la  
15 utilización en aplicaciones farmacéuticas se producen principalmente en células de mamífero tales como células CHO, células NS0, células Sp2/0, células COS, células HEK, células BHK, células PER.C6<sup>®</sup> y similares.

20 Para la aplicación humana cada sustancia farmacéutica debe cumplir unos criterios definidos. Para garantizar la seguridad de los agentes biofarmacéuticos para el ser humano, por ejemplo ácidos nucleicos, virus y proteínas de la célula huésped, que provocarían daños severos, deben ser eliminados. Para cumplir la norma reguladora, deben llevarse a cabo una o más etapas de purificación después del procedimiento de fabricación. Entre otros, la pureza, la producción y el rendimiento desempeñan un papel importante en la determinación de un procedimiento de purificación apropiada.

25 Debido a sus propiedades químicas y físicas, tales como el peso molecular y la arquitectura de dominios, incluyendo las modificaciones secundarias, el procesamiento posterior de las inmunoglobulinas resulta muy complicado. Por ejemplo, no sólo para fármacos formulados, sino también para intermediarios en el procesamiento posterior de recuperación y purificación (DSP), se requieren soluciones concentradas para conseguir volúmenes pequeños para una manipulación económica y el almacenamiento de aplicaciones. Además, resultan favorables los tiempos de  
30 concentración cortos para garantizar procedimientos limpios y tiempos operativos cortos. En este contexto, los procedimientos TFF imperfectos, especialmente tras las etapas de purificación finales, pueden provocar daños sostenidos, afectando incluso al producto farmacológico. La correlación entre el esfuerzo de cizalladura y la agregación en los procedimientos de concentración de flujo tangencial para soluciones de intermediarios de anticuerpos monoclonales (mAb) ha sido investigada por Ahner K. *et al.* (*J. Membr. Sci.* 274:108-115, 2006). Se ha  
35 realizado un seguimiento de la influencia del tiempo de concentración y flujos y presiones seleccionados sobre el rendimiento del procedimiento y el estado de agregación (ver, por ejemplo, Dosmar M. *et al.*, *Bioprocess Int.* 3:40-50, 2005; Luo R. *et al.*, *Bioprocess Int.* 4:44-46, 2006).

40 Mahler H.-C. *et al.* (*Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* 59:407-417, 2005) informan de la inducción y análisis de agregados en una formulación líquida de anticuerpo de IgG1 formada mediante diferentes métodos de estrés de agitación. En la patente US nº 6.252.055 se informa de una preparación concentrada de anticuerpo monoclonal. Se publica un método para la producción de una preparación concentrada de anticuerpo en la patente US nº 2006/0182740. Se publica un procedimiento combinado de ultrafiltración, diafiltración y segunda secuencia de ultrafiltración en la patente US nº 2006/0051347. En la patente EP nº 0 907 378 se publica un procedimiento para la  
45 concentración de una preparación de anticuerpo utilizando una ultrafiltración de flujo transversal con una tasa de recirculación fija de 250 ml/min. Los métodos para la filtración de flujo tangencial y un aparato para los mismos se publican en la patente US nº 2004/0167320. En la solicitud de patente WO nº 97/45140 se informa de una solución concentrada de anticuerpo.

50 Descripción resumida de la invención

La presente invención proporciona un método para la concentración de soluciones que contienen inmunoglobulinas producidas recombinantemente.

55 En mayor detalle, un aspecto de la presente invención es un método para concentrar una solución de inmunoglobulina mediante filtración de flujo tangencial, en la que la presión transmembranal y el flujo transversal que se aplican son variables, con una:

60 a) presión transmembranal de entre 1,4 bar y 1,6 bar y un flujo transversal de entre 75 ml/min y 90 ml/min en un intervalo de concentraciones de hasta 30 mg de inmunoglobulina por ml de solución que debe concentrarse,

b) presión transmembranal de entre 0,8 bar y 0,9 bar y un flujo transversal de entre 140 ml/min y 160 ml/min en un intervalo de concentraciones de entre 15 mg/ml y 55 mg/ml, y

c) presión transmembranal de entre 0,8 bar y 0,9 bar y un flujo transversal de entre 120 ml/min y 140 ml/min en un intervalo de concentraciones de entre 50 mg/ml y 275 mg/ml,

5 en el que la concentración real de la inmunoglobulina en la solución que debe concentrarse determina la presión transmembranal aplicada y el flujo cruzado, y se ajustan la presión transmembranal y el flujo transversal según la concentración real de la inmunoglobulina.

10 En una realización preferente, el intervalo de concentraciones en la etapa c) es de entre 50 mg/ml y 180 mg/ml. En una realización más preferente, el intervalo de concentraciones en la etapa c) es de entre 50 mg/ml y 130 mg/ml. En otra realización, la presión transmembranal y el flujo transversal son de 1,5 bar y 80 ml/min. en la etapa a), de 0,85 bar y 150 ml/min. en la etapa b) y/o de 0,85 bar y 130 ml/min en la etapa c). En otra realización, la solución de inmunoglobulina es una solución acuosa y tamponada de inmunoglobulina.

15 Otro aspecto de la presente invención es un método para la producción de una inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero, que comprende las etapas siguientes en este orden:

20 a) proporcionar una célula de mamífero recombinante que comprende uno o más ácidos nucleicos codificantes de una inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero,

b) cultivar la célula de la etapa a) bajo condiciones adecuadas para la expresión de la inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero,

25 c) recuperar la inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero, a partir de la célula de mamífero recombinante o del medio de cultivo,

30 d) concentrar la solución acuosa tamponada obtenida, que comprende la inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero utilizando una filtración de flujo tangencial con presión transmembranal y flujo transversal variables.

En una realización, la etapa d) del método comprende concentrar la solución acuosa tamponada obtenida utilizando una filtración de flujo tangencial con presión transmembranal y flujo transversal variables, con:

35 i) una presión transmembranal de entre 1,4 bar y 1,6 bar y un flujo transversal de entre 75 ml/min y 90 ml/min en un intervalo de concentraciones de hasta 30 mg de inmunoglobulina por ml de solución que debe concentrarse,

40 ii) una presión transmembranal de entre 0,8 bar y 0,9 bar y un flujo transversal de entre 140 ml/min y 160 ml/min en un intervalo de concentraciones de entre 15 mg/ml y 55 mg/ml, y

iii) una presión transmembranal de entre 0,8 bar y 0,9 bar y un flujo transversal de entre 120 ml/min y 140 ml/min en un intervalo de concentraciones de más de 45 mg/ml.

45 En otra realización, el método comprende antes de la etapa d) o después de la etapa d) la etapa siguiente:

e) purificar la solución acuosa tamponada que contiene la inmunoglobulina, la cual no es producida naturalmente por una célula de mamífero.

50 En otra realización, la inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero es una inmunoglobulina completa, o un fragmento de inmunoglobulina, o un conjugado de inmunoglobulina. En una realización, la célula de mamífero es una célula CHO, una célula HEK, una célula NS0, una célula Sp2/0, una célula COS, una célula HEK o una célula PER.C6®.

#### 55 Descripción detallada de la invención

La presente invención publica un método para la concentración de soluciones de inmunoglobulina hasta una concentración superior a 100 mg/ml. Inesperadamente se ha encontrado que con un método según la invención puede conseguirse lo anterior con una formación de agregados reducida y en un tiempo corto.

60 Las expresiones "filtración de flujo tangencial" o "FFT", las cuales se utilizan intercambiamente en la presente invención, se refieren a un procedimiento de filtración en el que una solución que contiene un polipéptido que debe concentrarse flujo a lo largo de la superficie, es decir tangencialmente a la superficie, de una membrana de filtración. La membrana de filtración presenta un tamaño de poro con un determinado valor de corte. En una realización, el

valor de corte se encuentra comprendido en el intervalo de entre 20 kDa y 50 kDa, preferentemente es de 30 kDa. Este procedimiento de filtración es un tipo de procedimiento de ultrafiltración. La expresión "flujo transversal" se refiere al flujo de la solución que debe concentrarse que es tangencial a la membrana (flujo de fracción retenida). El término "flujo" o "flujo de permeado", que pueden utilizarse intercambiabilmente en la presente invención, se refiere al flujo de fluido a través de la membrana, es decir, por los poros de la membrana. Es decir, se refiere a la tasa volumétrica de flujo de permeado a través de la membrana. Un flujo habitualmente se indica en término de volumen por unidad de área de membrana por unidad de tiempo, como litros/m<sup>2</sup>/h (LMH). En una realización, el flujo transversal se caracteriza porque el flujo transversal se expresa en ml/min para un área de membrana de 0,02 m<sup>2</sup>. En otra realización, el flujo transversal es, en las etapas individuales, 240 l/m<sup>2</sup>/h, 450 l/m<sup>2</sup>/h y 390 l/m<sup>2</sup>/h. El permeado comprende el solvente de la solución que debe concentrarse, así como moléculas con un peso molecular inferior al valor de corte de la membrana utilizada pero no de la inmunoglobulina heteróloga. Las expresiones "presión transmembranal" o "PTM", las cuales pueden utilizarse intercambiabilmente en la presente invención, se refieren a la presión que se aplica para mover el solvente y componentes menores que el valor de corte de la membrana de filtración a través de los poros de la misma. La presión transmembranal es una presión media de la entrada, la salida y el permeado, y puede calcularse como:

$$TMP = \frac{(p_{in} + p_{out})}{2} - p_{permeado}$$

El término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste de uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los diferentes genes de región constante, así como la multitud de genes de región variable de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en una diversidad de formatos, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como cadenas sencillas (scFv) o diacuerpos (por ejemplo Huston J.S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988; Bird R.E. *et al.*, Science 242:423-426, 1988; en general Hood *et al.*, Immunology, Benjamin N.Y., 2a edición, 1984, y Hunkapiller T. y Hood L., Nature 323:15-16, 1986).

La expresión "inmunoglobulina completa" se refiere a una inmunoglobulina que comprende dos polipéptidos denominados de cadena ligera de inmunoglobulina (cadena ligera) y dos polipéptidos denominados de cadena pesada de inmunoglobulina (cadena pesada). Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de una inmunoglobulina completa contiene un dominio variable (región variable) (generalmente la parte aminoterminal de la cadena polipeptídica) que comprende regiones de unión que son capaces de interactuar con un antígeno. Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina de una inmunoglobulina completa comprende además una región constante (generalmente la parte carboxilo-terminal). La región constante de la cadena pesada media en la unión del anticuerpo a: i) células que portan un receptor Fcγ (FcγR), tales como las células fagocíticas, o ii) células que portan el receptor Fc neonatal (FcRn), también conocido como receptor Brambell. También media en la unión a algunos factores, incluyendo factores del sistema clásico del complemento, tal como el componente (C1q). El dominio variable de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina a su vez comprende diferentes segmentos, es decir, cuatro regiones marco (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).

La expresión "fragmento de inmunoglobulina" se refiere a un polipéptido que comprende por lo menos un dominio del dominio variable, el dominio C<sub>H1</sub>, la región bisagra, el dominio C<sub>H2</sub>, el dominio C<sub>H3</sub>, el dominio C<sub>H4</sub> de una cadena pesada, el dominio variable o el dominio C<sub>L</sub> de una cadena ligera. También se encuentran comprendidos los derivados y variantes del mismo. Por ejemplo, puede encontrarse presente un dominio variable en el que se han delecionado uno o más aminoácidos o regiones de aminoácidos.

La expresión "conjugado de inmunoglobulina" se refiere a un polipéptido que comprende por lo menos un dominio de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina conjugada mediante un enlace peptídico a un polipéptido adicional. El polipéptido adicional es un péptido no inmunoglobulina, tal como una hormona, un receptor de crecimiento o péptido antifusogénico, o factor del complemento, o similar.

Los métodos cromatográficos generales y su utilización son conocidos por el experto en la materia. Ver, por ejemplo, Chromatography, 5a edición, Part A: Fundamentals and Techniques, Heftmann E. (editor), Elsevier Science Publishing Company, New York, 1992; Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Deyl, Z. (ed.), Elsevier Science BV, Amsterdam, Países Bajos, 1998; Chromatography Today, Poole C. F. y Poole S. K., Elsevier Science Publishing Company, New York, 1991; Scopes, Protein Purification Principles and Practice, 1982; Sambrook J. *et al.* (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; o Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F. M. *et al.* (editores), John Wiley & Sons, Inc., New York.

Para la purificación de inmunoglobulinas heterólogas producidas recombinantemente, con frecuencia se utiliza una combinación de diferentes etapas de cromatografía de columna. Generalmente tras una cromatografía de afinidad con proteína A se lleva a cabo una o dos etapas adicionales de separación. La etapa de purificación final es una denominada "etapa de acabado" para la eliminación de impurezas y contaminantes residuales, tales como inmunoglobulinas agregadas, PCH (proteínas de la célula huésped) residuales, ADN (ácidos nucleicos de la célula huésped), virus o endotoxinas. Para esta etapa de acabado con frecuencia se utiliza un material de intercambio aniónico en un modo dinámico.

Una serie de diferentes métodos se encuentran bien establecidos y son ampliamente utilizados para la recuperación y purificación de proteínas, tales como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo la cromatografía de afinidad con proteína A o con proteína G), la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo de intercambio catiónico (resinas carboximetilo), de intercambio aniónico (resinas aminoetilo) y de intercambio de modo mixto), la adsorción tiofílica (por ejemplo con  $\beta$ -mercaptoetanol y con otros ligandos SH), la cromatografía de interacción hidrofóbica o de adsorción aromática (por ejemplo con fenil-sefarosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), la cromatografía de afinidad de quelato metálico (por ejemplo con material de afinidad por el Ni(II) y por el Cu(II)), la cromatografía de exclusión por tamaño, y métodos electroforéticos (tales como la electroforesis en gel y la electroforesis capilar) (Vijayalakshmi M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75:93-102, 1998).

La expresión "inmunoglobulina heteróloga" se refiere a una inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero. La inmunoglobulina producida según el método de la invención se produce por medios recombinantes. Dichos métodos son ampliamente conocidos del estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células eucarióticas con la posterior recuperación y aislamiento de la inmunoglobulina heteróloga y habitualmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la producción, es decir la expresión, de una inmunoglobulina, se insertan un ácido nucleico codificante de la cadena ligera y un ácido nucleico codificante de la cadena pesada, cada uno en un casete de expresión, mediante métodos estándares. Los ácidos nucleicos codificantes de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina se aíslan y se secuencian mediante procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dichos ácidos nucleicos. Los casetes de expresión pueden insertarse en uno o más plásmidos de expresión, que seguidamente se transfectan en la célula huésped, que de otra manera no produciría inmunoglobulinas. La expresión se lleva a cabo en células huésped procarióticas o eucarióticas apropiadas y la inmunoglobulina se recupera de las células tras la lisis o a partir del sobrenadante de cultivo.

La expresión "solución de inmunoglobulina" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una solución acuosa tamponada que contiene una inmunoglobulina completa, un fragmento de inmunoglobulina o un conjugado de inmunoglobulina. Esta solución puede ser, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo o un eluido de cromatografía de columna o una solución de inmunoglobulina purificada.

La expresión "ADN heterólogo" o "polipéptido heterólogo" se refiere a una molécula de ADN o a un polipéptido, o a una población de moléculas de ADN o a una población de polipéptidos, que no existe naturalmente dentro de una célula huésped dada. Las moléculas de ADN heterólogas respecto a una célula huésped particular pueden contener ADN derivado de la especie de célula huésped (es decir, ADN endógeno), con la condición de que el ADN huésped se combine con ADN no del huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no del huésped codificante de un polipéptido operablemente ligado a un segmento de ADN huésped que comprende un promotor se considera que es una molécula de ADN heterólogo.

A la inversa, una molécula de ADN heterólogo puede comprender un gen estructural endógeno operablemente ligado a un promotor exógeno. Un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN no del huésped es un péptido o polipéptido "heterólogo".

La expresión "bajo condiciones adecuadas para la expresión de la inmunoglobulina heteróloga" se refiere a condiciones que se utilizan para el cultivo de una célula de mamífero que expresa una inmunoglobulina y que son conocidas o que pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la materia. También es conocido para el experto en la materia que estas condiciones pueden variar dependiendo del tipo de célula de mamífero cultivada y del tipo de inmunoglobulina expresada. En general, la célula de mamífero se cultiva a una temperatura de entre 20°C y 40°C y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la producción efectiva de la proteína inmunoglobulina, por ejemplo durante 4 a 28 días.

La expresión "célula de mamífero recombinante" se refiere a una célula en la que puede introducirse/transfectarse o en la que se introduce/transfecta un ácido nucleico, por ejemplo codificante de un polipéptido heterólogo. El término "célula" incluye células que se utilizan para la expresión de ácidos nucleicos. En una realización, la célula de mamífero es una célula CHO (por ejemplo CHO K1, CHO DG44) o una célula BHK o una célula NS0, o una célula SP2/0, o una célula HEK 293, o una célula EBNA HEK 293, o una célula PER.C6<sup>®</sup> o una célula COS. En una realización preferente, la célula de mamífero es una célula CHO, o una célula BHK, o una célula HEK, o una célula

Sp2/0, o una célula PER.C6<sup>®</sup>. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "célula" incluye la célula sujeto y su progenie. De esta manera, la expresión "célula recombinante" incluye la célula primaria transfectada y los cultivos que incluyen las células de progenie derivadas de la misma con independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. La progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica que la célula originalmente transformada se encuentra incluida.

El término "tamponado" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una solución en la que los cambios de pH debidos a la adición o liberación de sustancias ácidas o básicas resultan compensados por una sustancia tampón. Puede utilizarse cualquier sustancia tampón que resulte en dicho efecto. En una realización se utilizan sustancias tampón farmacéuticamente aceptables, tales como, por ejemplo, ácido fosfórico o sales del mismo, ácido acético o sales del mismo, ácido cítrico o sales del mismo, morfina o sales de la misma, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico o sales del mismo, histidina o sales de la misma, glicina o sales de la misma, o tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) o sales del mismo. En una realización preferente, la sustancia tampón es ácido fosfórico o sales del mismo, ácido acético o sales del mismo, o ácido cítrico o sales del mismo, o histidina o sales del mismo. Opcionalmente, la solución tamponada puede comprender una sal adicional, tal como, por ejemplo, cloruro sódico y/o sulfato sódico, y/o cloruro potásico, y/o sulfato potásico, y/o citrato sódico, y/o citrato potásico. En una realización de la invención, el valor de pH de la solución acuosa tamponada es de entre 3,0 y 10,0, preferentemente de entre 3,0 y 7,0, más preferentemente de entre 4,0 y 6,0, y todavía más preferentemente de entre 4,5 y 5,5.

Ahora se ha encontrado inesperadamente que con un método de filtración de flujo tangencial (FFT) según la presente invención, en la que la presión transmembranal y el flujo transversal son variables durante el procedimiento de filtración y están adaptados a la concentración real de la inmunoglobulina en la solución que debe concentrarse, puede obtenerse una solución concentrada de inmunoglobulina con baja formación de agregados en un tiempo corto. Es decir, inesperadamente se ha encontrado que la formación de agregados durante la filtración de flujo tangencial es baja en el caso de que se aplique un método de FFT según la invención, es decir, un método en el que durante el procedimiento de filtración se modifica la presión transmembranal y se adapta según la concentración real de la solución de anticuerpo. El método según la invención es un método variable en comparación con los métodos constantes conocidos de la técnica, es decir, con métodos en los que la presión transmembranal se alcanza previamente al procedimiento de filtración y se mantiene constante durante el procedimiento completo de filtración de flujo tangencial.

La presente invención comprende un método para concentrar una solución de inmunoglobulina mediante filtración de flujo tangencial, en el que la presión transmembranal y el flujo tangencial, los cuales son aplicados, son variables y se modifican durante el procedimiento de filtración dependiendo de la concentración de inmunoglobulina en la solución concentrada de inmunoglobulina, en el que:

- a) se aplica una presión transmembranal de entre 1,4 bar y 1,6 bar y un flujo transversal de entre 75 ml/min y 90 ml/min en un intervalo de concentraciones de hasta 30 mg de inmunoglobulina por ml de la solución que debe concentrarse,
- b) se aplica una presión transmembranal de entre 0,8 bar y 0,9 bar y un flujo transversal de entre 140 ml/min y 160 ml/min en un intervalo de concentraciones de entre 15 mg/ml y 55 mg/ml, y
- c) se aplica una presión transmembranal de entre 0,8 bar y 0,9 bar y un flujo transversal de entre 120 ml/min y 140 ml/min en un intervalo de concentraciones de entre 50 mg/ml y 275 mg/ml.

Existe una correlación entre el esfuerzo de cizalladura en la FFT y la formación de agregados. Con el fin de evaluar el efecto, se calculó el esfuerzo de cizalladura inducido por el flujo,  $\tau_w$ , sobre la superficie de la membrana utilizada, utilizando la fórmula siguiente:

$$\tau_w = \frac{d_H(\Delta p)}{4L}$$

en la que  $d_H$  es:

$$d_H = 4 \frac{ab}{2(a+b)}$$

según Gerhart *et al.* (Fundamentals of Fluid Mechanics, Addison-Wesley Publishing Company, 1993) y Cheryan *et*

al. (Ultrafiltration and Microfiltration Handbook, segunda edición, CRC Press LLC, 1998). En esta fórmula,  $d_H$  es el diámetro hidráulico,  $a$  es la anchura,  $b$  es la altura y  $L$  es la longitud del canal de flujo. Además,  $\Delta p = p_i - p_o$ , en donde  $p_i$  es la presión de entrada aplicada y  $p_o$  es la presión de salida. En un ejemplo, se utilizó una membrana Hydrosart™ (Sartocon Slice 200 Hydrosart™, de Sartorius AG, Göttingen, Alemania), que consiste de celulosa regenerada, con un valor de corte de peso molecular nominal de 30 kDa y un área de membrana de 0,02 m<sup>2</sup>. Para el casete de membrana utilizado se calculó un diámetro hidráulico de 1,08 mm. La membrana se operó en primer lugar con un método de FFT estándar, es decir, sin modificar la presión transmembranal y el flujo transversal durante el procedimiento de concentración. Se analizaron tres métodos constantes diferentes con un  $\Delta p$  constante prefijado y una presión transmembranal (PTM) constante prefijada de 0,6 bar.

Tabla 1: Vista global de las diferencias de presión aplicadas y los esfuerzos de cizalladura correspondientes.

$\Delta p$ [bar]	$\tau_w$ [Pa]
1,2	216
1,8	324
3,0	541

Mediante la observación del flujo frente a la concentración creciente de proteína no se observó ninguna diferencia significativa en las curvas de los procedimientos a diferente  $\Delta p$ . Sin embargo, para el modo a 3 bar se observó una concentración de rango inferior debido a una presión de entrada elevada. En comparación con un modo de concentración llevado a cabo bajo un flujo transversal (FT) constante más bajo (90 ml/min.) y un  $\Delta p$  medio más bajo (aproximadamente 0,9 bar), un  $\Delta p$  más alto de entre 1,2 y 1,8 bar contribuye a un rendimiento del flujo mejorado en el tiempo y a una concentración final más alta (PTM constantemente 0,6 bar).

La comparación entre los datos de turbidez, oscurecimiento óptico (OO) y dispersión lumínica dinámica (DLD) antes y después del procedimiento de concentración mostró una formación de agregados incrementada al incrementarse el esfuerzo de cizalladura (figura 2).

Se ha desarrollado un método FFT con un tiempo global de procedimiento comparable al modo de presión de entrada elevada productor de estrés ( $\Delta p = 3$  bar), basándose en experimentos exploratorios de PTM/FT (ver, por ejemplo, Luo R. *et al.*, Bioprocess Int. 4:44-54, 2006). El método según la invención se ha desarrollado para mejorar el rendimiento de flujo en el tiempo, con una menor formación de agregados de inmunoglobulina, es decir, para combinar una baja formación de agregados y un tiempo global corto de concentración. Durante el desarrollo del método según la invención se llevó a cabo una exploración de PTM y FT según la concentración predominante de inmunoglobulina en la solución de inmunoglobulina que debía concentrarse. Se encontró un método con PTM y FT adaptados dependiente del perfil de flujo óptimo a una concentración dada. Sin la desventaja de una presión de entrada elevada en el estado final de concentración (ver, por ejemplo, Dosmar M. *et al.*, Bioprocess Int. 3:40-50, 2005), el método según la invención mostró una carga de agregación baja en los datos de turbidez, OO y DLD para los concentrados producidos (ver las figuras 3 y 4). Además, se alcanzó una concentración final más elevada utilizando el método según la invención.

En el método según la invención, la presión transmembranal y el flujo transversal variaron con respecto a la concentración real de la solución de inmunoglobulina concentrada. En una realización, el método según la invención es un método de filtración de flujo tangencial variable en el que la concentración real de la inmunoglobulina en la solución que debe concentrarse determina la presión transmembranal aplicada y el flujo transversal. De esta manera, se ajustan la presión transmembranal y el flujo transversal según la concentración real de la inmunoglobulina con el fin de reducir el estrés aplicado y, de esta manera, reducir la formación de moléculas de inmunoglobulina agregadas y para proporcionar un tiempo global de concentración corto.

En el método según la invención se definen tres intervalos de concentración. El primer intervalo real de concentraciones de la solución que debe concentrarse es de entre 0 mg/ml y 30 mg/ml, el segundo intervalo real de concentraciones es de entre 15 mg/ml y 55 mg/ml, y el tercer intervalo real de concentraciones es de entre 45 mg/ml y 180 mg/ml. Tal como puede observarse, estos intervalos de concentraciones son solapantes. Se ha encontrado que en los intervalos solapantes de concentraciones de entre 15 mg/ml y 30 mg/ml y de entre 45 mg/ml y 55 mg/ml, pueden utilizarse diferentes valores para la presión transmembranal y el flujo transversal en el método según la invención. En estos intervalos solapantes de concentraciones, puede aplicarse cualquiera de las dos configuraciones de PTM y FT sin ningún efecto notable sobre la formación de agregados o el tiempo del procedimiento.

De esta manera, en una realización del método según la invención pueden modificarse las condiciones de a) a b) y de b) a c) a cualquier valor de concentración en los intervalos solapantes de concentración.

En otra realización, la presión transmembranal y el flujo transversal son de 1,5 bar y 80 ml/min. en la etapa a), de

0,85 bar y 150 ml/min. en la etapa b) y/o de 0,85 bar y 130 ml/min en la etapa c). En otra realización, la solución de inmunoglobulina es una solución acuosa tamponada de inmunoglobulina. En una realización, el intervalo de concentraciones en la etapa a) es de entre 5 y 25 mg/ml, en la etapa b) es de entre 25 y 50 mg/ml y en la etapa c) es de entre 50 y 140 mg/ml.

5 Otro aspecto de la presente invención es un método para la producción de una inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero, que comprende las etapas siguientes en el orden siguiente:

10 a) proporcionar una célula de mamífero recombinante que comprende uno o más ácidos nucleicos codificantes de una inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero,

b) cultivar la célula de mamífero bajo condiciones adecuadas para la expresión de la inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero,

15 c) recuperar la inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero a partir de la célula de mamífero recombinante o del medio de cultivo en forma de solución acuosa tamponada,

20 d) concentrar la solución acuosa tamponada obtenida, que comprende la inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero, utilizando una filtración de flujo tangencial, concentración de la inmunoglobulina dependiente de la presión transmembranal y flujo transversal.

Una realización del método de producción según la invención comprende la etapa d), de concentración de la solución acuosa tamponada obtenida, utilizando una filtración de flujo tangencial con presión transmembranal y flujo transversal variables y dependientes de la concentración de inmunoglobulina, con:

25 i) una presión transmembranal de entre 1,4 bar y 1,6 bar y un flujo transversal de entre 75 ml/min y 90 ml/min en un intervalo de concentraciones de hasta 30 mg de inmunoglobulina por ml de solución que debe concentrarse,

30 ii) una presión transmembranal de entre 0,8 bar y 0,9 bar y un flujo transversal de entre 140 ml/min y 160 ml/min en un intervalo de concentraciones de entre 15 mg/ml y 55 mg/ml, y

iii) una presión transmembranal de entre 0,8 bar y 0,9 bar y un flujo transversal de entre 120 ml/min y 140 ml/min en un intervalo de concentraciones de entre 50 mg/ml y 275 mg/ml.

35 En otra realización, el método comprende previamente a, es decir antes de, o después de la etapa d), la etapa siguiente:

40 e) purificar la solución acuosa tamponada que contiene la inmunoglobulina, la cual no es producida naturalmente por una célula de mamífero.

La purificación en la etapa e) puede realizarse mediante diferentes métodos y técnicas, tales como una etapa de cromatografía, o una combinación de etapas cromatográficas diferentes o similares, o la precipitación, o la precipitación en forma de sales, o la ultrafiltración, o la diafiltración, o la liofilización, o el cambio de tampón, o combinaciones de los mismos, o similares.

45 En otra realización, la inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero es una inmunoglobulina completa, o un fragmento de inmunoglobulina, o un conjugado de inmunoglobulina. En una realización, la célula de mamífero es una célula CHO, una célula HEK, una célula NS0, una célula Sp2/0, una célula COS, una célula HEK o una célula PER.C6<sup>®</sup>. En una realización preferente, la célula de mamífero es una célula CHO, o una célula BHK, o una célula HEK, o una célula Sp2/0, o una célula PER.C6<sup>®</sup>.

55 Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

60 Se encontraban disponibles un anticuerpo anti-IL-1R (ver, por ejemplo, la solicitud de patente WO n° 2005/023872) y un anticuerpo anti-selectina-P (ver, por ejemplo, la solicitud de patente WO n° 2005/100402) en cantidades suficientes en los propios laboratorios en el momento de la invención y, por lo tanto, la presente invención se ejemplifica con estas dos inmunoglobulinas. De manera similar, la invención en general puede ponerse en práctica con cualquier inmunoglobulina. La presente descripción ejemplificada se proporciona únicamente a título de ejemplo y no de modo limitativo de la invención.

Descripción de las figuras

- Figura 1 Flujo frente a concentración de proteína de una solución de anticuerpo anti-IL-1R antes de enjuagar la membrana para diferentes modos de  $\Delta p$  constante y un método de concentración bajo FT constante de 90 ml/min. 1: método constante  $\Delta p=1,2$  bar, 2: método constante  $\Delta p=1,8$  bar, 3: método constante  $\Delta p=3,0$  bar, 4: método constante FT: 90 ml/min.
- Figura 2 Número de partículas antes y después de la concentración de una solución de anticuerpo anti-IL-1R utilizando un método constante.  
1: antes de la concentración, 2:  $\tau_w=216$ , 3:  $\tau_w=324$ , 4:  $\tau_w=541$ .
- Figura 3 Comparación entre el número de partículas de una solución de anticuerpo anti-IL-1R antes y después de la concentración utilizando diferentes métodos. 1: antes de la concentración, 2: método variable según la invención, 3: método constante FT: 90 ml/min., 4:  $\tau_w=541$ .
- Figura 4 Flujo frente a concentración de proteína de una solución de anticuerpo anti-IL-1R. 1: método constante FT: 90 ml/min., 2:  $\tau_w=541$ , 3: método variable según la invención.
- Figura 5 Flujo transmembranal frente a presión transmembranal de una solución de anticuerpo anti-IL-1R a una concentración de proteína de 5,3 mg/ml para flujos transversales de 50 ml/min (círculos negros), 80 ml/min (triángulos negros) y 130 ml/min. (cuadrados negros).
- Figura 6 Flujo transmembranal frente a presión transmembranal de una solución de anticuerpo anti-IL-1R a una concentración de proteína de 45 mg/ml para flujos transversales de 80 ml/min (círculos negros), 130 ml/min (triángulos negros) y 150 ml/min. (cuadrados negros).
- Figura 7 Flujo transmembranal frente a presión transmembranal de una solución de anticuerpo anti-IL-1R a una concentración de proteína de 90 mg/ml para flujos transversales de 50 ml/min (círculos negros), 80 ml/min (triángulos negros) y 130 ml/min. (cuadrados negros).
- Figura 8 Flujo transmembranal frente a presión transmembranal de una solución de anticuerpo anti-IL-1R a una concentración de proteína de 180 mg/ml para flujos transversales de 50 ml/min (círculos negros), 80 ml/min (triángulos negros) y 130 ml/min. (cuadrados negros).
- Figura 9 Análisis de partículas del concentrado de una solución de anticuerpo anti-IL-1R en tampón citrato obtenida mediante diferentes métodos. 1: antes de la concentración, 2: método variable según la invención, 3: método constante FT: 90 ml/min., 4: método constante  $\Delta p=1,8$  bar, 5: método constante  $\Delta p=3,0$  bar.
- Figura 10 Análisis de dispersión lumínica dinámica del concentrado de una solución de anticuerpo anti-IL-1R en tampón citrato obtenida mediante diferentes métodos. Rombos negros: antes de la concentración; cuadrados negros: método variable según la invención; triángulos negros: método constante FT: 90 ml/min.; círculos negros: método constante  $\Delta p=1,8$  bar.
- Figura 11 Medición de la turbidez del concentrado de una solución de anticuerpo anti-IL-1R en tampón citrato obtenida mediante diferentes métodos. 1: antes de la concentración, 2: método variable según la invención, 3: método constante FT: 90 ml/min., 4: método constante  $\Delta p=1,8$  bar, 5: método constante  $\Delta p=3,0$  bar.
- Figura 12 Medición de la turbidez de concentrados de una solución de anticuerpo anti-IL-1R obtenidos mediante el método según la invención y un método constante con diferentes tampones. 1: antes de la concentración en tampón citrato, 2: método variable según la invención con tampón citrato, 3: método constante  $\Delta p=3,0$  bar con tampón citrato, 4: antes de la concentración en tampón histidina, 5: método variable según la invención con tampón histidina, 6: método constante  $\Delta p=3,0$  bar con tampón histidina.
- Figura 13 Análisis de dispersión lumínica dinámica de concentrados obtenidos mediante diferentes métodos y obtenidos en diferentes tampones: a) anticuerpo anti-IL-1R en tampón citrato (rombos negros: antes de la concentración; cuadrados negros: después de la concentración mediante el método variable según la invención; triángulos negros: método constante  $\Delta p = 1,8$  bar), b) anticuerpo anti-IL-1R en tampón histidina (rombos negros: antes de la concentración; cuadrados negros: después de la concentración mediante el método variable según la invención; triángulos negros: método constante  $\Delta p = 3,0$  bar).
- Figura 14 Resultados de mediciones de la turbidez (a) y de la dispersión lumínica dinámica (b) de la concentración de un anticuerpo anti-selectina-P en tampón histidina. 1: antes de la concentración (rombos negros), 2: método variable según la invención (cuadrados negros), 3: método constante  $\Delta p = 3,0$  bar (triángulos negros).
- Figura 15 Efecto del modo de concentración sobre la filtrabilidad de soluciones concentradas de inmunoglobulina.

55 Ejemplo 1

Métodos analíticos

60 a) Medición de la turbidez.

Se determinó la absorbancia fotométrica a 350 nm y a 550 nm, en donde ningún cromóforo intrínseco en la solución de anticuerpo absorbe (espectrofotómetro de UV-Vis Evolution 500, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Las muestras se midieron sin diluir. A modo de medio de referencia se utilizó la solución tampón apropiada. Cada

medición se llevó a cabo tres veces.

b) HPLC de exclusión por tamaño.

5 La cromatografía se llevó a cabo con una columna Tosoh Haas TSK 3000 SWXL en un sistema de HPLC ASI-100 (Dionex, Idstein, Alemania). Se realizó un seguimiento de los picos de elución a 280 nm con un detector de matriz de diodos de UV (Dionex). Tras la disolución de las muestras concentradas a 1 mg/ml, la columna se lavó con un tampón que consistía de dihidrogenofosfato potásico 200 mM y cloruro potásico 250 mM, pH 7,0, hasta alcanzar una línea base estable. Las operaciones de análisis se llevaron a cabo bajo condiciones isocráticas utilizando un caudal de 0,5 ml/min. durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los cromatogramas se integraron manualmente utilizando Chromeleon (Dionex, Idstein, Alemania). Se determinó la agregación en % comparando el área bajo la curva (AUC) de las formas de elevado peso molecular con la AUC del pico de monómero.

c) Oscurecimiento óptico.

15 Para realizar un seguimiento de la carga de partículas en un intervalo de 1 a 200  $\mu\text{m}$ , se utilizó un analizador de partículas SVSS-C (PAMAS Partikelmess-und Analyse systeme, Rutesheim, Alemania). El sistema se calibró siguiendo los requisitos de la Farmacopea US vol. 24, <788>, con esferas de poliestireno de tamaño prácticamente constante. Se llevaron a cabo tres mediciones de un volumen de 0,5 ml con un volumen pre-enjuague de 0,5 ml. Los resultados se calcularon como valores promedio y referidos a un volumen de muestra de 1,0 ml. El número de partículas contadas se encontraba dentro del límite de concentración del sensor.

d) Dispersión lumínica dinámica (DLD).

25 La DLD es una técnica no invasiva para la medición del tamaño de las partículas, típicamente en el orden submicrométrico de tamaños. En la presente invención, se utilizó el aparato Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) con una cubeta de cuarzo de temperatura controlada (25°C) para el seguimiento de un intervalo de tamaños de entre 1 nm y 6  $\mu\text{m}$ . Se detectó la intensidad de la luz láser retrodispersada en un ángulo de 173°. La intensidad fluctúa a una tasa que es dependiente de la velocidad de difusión de las partículas, que a su vez está gobernada por el tamaño de las partículas. Por lo tanto, pueden generarse datos de tamaños de partícula a partir de un análisis de las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada (Dahneke B.E. (editor), Measurement of Suspended Particles by Quasielectric Light Scattering, Wiley Inc. (1983); Pecora, R., Dynamic Light Scattering: Application of Photon Correlation Spectroscopy, Plenum Press, 1985). Se calculó la distribución de tamaños según la intensidad utilizando el modo estrecho múltiple del software DTS (Malvern). Los experimentos se llevaron a cabo con muestras no diluidas.

e) Espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier.

40 El espectro de IR-TF de las soluciones de proteína no diluidas se registraron mediante la utilización de un espectrómetro Tensor 27 (Bruker Optik, Ettlingen, Alemania) dotado de una celda de circulación (AquaSpec) conectada a un termostato. Para cada espectro, se registró un interferograma de 120 barridos en modo de haz único con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . A modo de medio de referencia se utilizó el permeado apropiado. El interferograma recogido de la proteína y el sistema tampón se transformaron por el método de Fourier. Además, se recogió el espectro de la proteína para el espectro del sistema tampón correspondiente.

Ejemplo 2

Determinación de las condiciones de PTM y FT

50 Una solución acuosa tamponada con citrato acondicionada y filtrada (pH 5,5) de un anticuerpo anti-IL-1R se concentró veinte veces hasta 100 mg/ml mediante la utilización de un sistema de FFT automático ÄKTACrossflow™ (GE Healthcare, Amersham Bioscience AB, Uppsala, Suecia) mediante la utilización de un casete de lámina plana escalable (Sartorius, Göttingen, Alemania) con una membrana Hydrosart™ de celulosa regenerada, con un valor de corte molecular nominal de 30 kDa y un área de membrana de 0,02  $\text{m}^2$ . Se llevaron a cabo diferentes programas de concentración generados con el software UNICORN, de control de ÄKTA crossflow™. La carga total de membrana fue de aproximadamente 400  $\text{g}/\text{m}^2$ .

60 Se determinaron los perfiles de flujo y de presión a cuatro presiones transmembranales prefijadas, a diferentes concentraciones de inmunoglobulina en la solución de inmunoglobulina que debía concentrarse con respecto a diferentes flujos transversales. Se fijó la PTM a 0,3 bar, 0,5 bar, 0,9 bar ó 2,0 bar. Los flujos transversales para cada PTM y concentración de proteína fueron de 50 ml/min, 80 ml/min, 130 ml/min (no a una concentración de proteína de 45 mg/ml) y 150 ml/min. (sólo a la concentración de proteína de 45 mg/ml). Las diferentes concentraciones de proteína eran 5,3 mg/ml, 45 mg/ml, 90 mg/ml y 180 mg/ml. Se muestran los resultados en las figuras 5 a 8.

Se ha encontrado durante los procedimientos de concentración que un flujo de alimentación elevado y una presión de alimentación elevada resultan en un buen flujo transmembranal. Sin embargo, durante el procedimiento de concentración, especialmente al final, se establece una capa de polarización que resulta en una sobrepresión de la membrana y también en una reducción del flujo (permeado). También se encontró que una presión de alimentación incrementada resultaba en un flujo más alto y por lo tanto en un procedimiento de concentración rápido, aunque esta aceleración se veía acompañada de una formación incrementada de agregados (figuras 9 a 11).

5  
10 Considerando lo anteriormente expuesto, se encontró que los intervalos y condiciones para un método mejorado de concentración de inmunoglobulina eran:

- una presión transmembranal de entre 1,4 bar y 1,6 bar y un flujo transversal de entre 75 ml/min y 90 ml/min en un intervalo de concentraciones de hasta 30 mg de inmunoglobulina por ml de solución que debe concentrarse,

15 - una presión transmembranal de entre 0,8 bar y 0,9 bar y un flujo transversal de entre 140 ml/min y 160 ml/min en un intervalo de concentraciones de entre 15 mg/ml y 55 mg/ml, y

20 - una presión transmembranal de entre 0,8 bar y 0,9 bar y un flujo transversal de entre 120 ml/min y 140 ml/min en un intervalo de concentraciones de más de 45 mg/ml.

Estos parámetros resultan en un método que presenta una formación de agregados reducida y un tiempo de concentración corto.

### Ejemplo 3

25 Comparación del método variable según la invención con métodos constantes.

Se comparó el método según la invención con diferentes métodos de parámetro constante para la producción de una solución concentrada de inmunoglobulina. Se fijó la concentración diana en 90 mg/ml. Se llevó a cabo la filtración de flujo tangencial con los dispositivos según el Ejemplo 2. Los diferentes parámetros de los métodos comparados (los métodos 1 a 4 son métodos constantes; el método 5 es el método variable según la invención) eran los siguientes:

35 Método 1: presión transmembranal=0,6 bar  
flujo transversal=90 ml/min  
 $\Delta p=0,7$  bar

40 Método 2: presión transmembranal=0,6 bar  
 $\Delta p=1,2$  bar

Método 3: presión transmembranal=0,6 bar  
 $\Delta p=1,8$  bar

45 Método 4: presión transmembranal=0,6 bar  
 $\Delta p=3,0$  bar

Método 5:

50 a) presión transmembranal=1,5 bar,  $\Delta p = 0,5$  bar,  
b) presión transmembranal=0,85 bar,  $\Delta p = 1,2$  bar,  
c) presión transmembranal=0,85 bar.

Los diferentes parámetros y el tiempo requerido para conseguir una concentración de la solución de inmunoglobulina hasta 90 mg/ml se muestran en la Tabla 2.

55 Tabla 2: Comparación de los parámetros para diferentes métodos de concentración

Método	$\Delta p$	PMT	Presión de alim.	Presión de ret.	Flujo de alim.	Flujo de ret.	Partículas > 1 $\mu m/ml$	tiempo
1	0,7 bar	0,6 bar	1,2 bar	0,5 bar	100 ml/min	90 ml/min	7321820	149 min.
2	1,2 bar	0,6 bar	0,2 bar	170 ml/min	170 ml/min	160 ml/min	15403850	126 min.

3	1,8 bar	0,6 bar	0,3 bar	230 ml/min	230 ml/min	215 ml/min	16989540	125 min.
4	3,0 bar	0,6 bar	0,2 bar	300 ml/min	300 ml/min	280 ml/min	19415180	116 min.
5	0,5 bar	1,5 bar	1,5 bar	100 ml/min	100 ml/min	80 ml/min	12182240	118 min.
	1,2 bar	0,85 bar	0,5 bar	165 ml/min	165 ml/min	150 ml/min		
	--	0,85 bar	0,5 bar	135 ml/min	135 ml/min	130 ml/min		

A partir de los resultados de los diferentes métodos puede observarse que con el método 5, es decir, con un método variable, en comparación con los métodos 2 a 4 puede obtenerse una formación de agregados drásticamente menor y, de esta manera, un concentrado de inmunoglobulina con características mejoradas. En comparación con el método 1 puede conseguirse un procedimiento de concentración más rápido.

Ejemplo 4

Concentración de un anticuerpo anti-IL-1R en diferentes sistemas tampón

Se llevó a cabo una concentración comparativa de una solución acuosa de anticuerpo anti-IL-1R con tampón citrato o tampón histidina utilizando el dispositivo del Ejemplo 2 y el método según la invención (método 5 del Ejemplo 3). Se muestran los resultados en las figuras 12 y 13. A partir de las figuras 12 y 13, respectivamente, puede observarse que el tampón utilizado no presenta ningún efecto sobre el procedimiento de concentración según la invención.

Ejemplo 5

Concentración de un anticuerpo anti-selectina-P

Se llevó a cabo la concentración de un anticuerpo anti-selectina-P según el método del Ejemplo 2 y se muestran los resultados en la figura 14.

Ejemplo 6

Filtración de solución concentrada

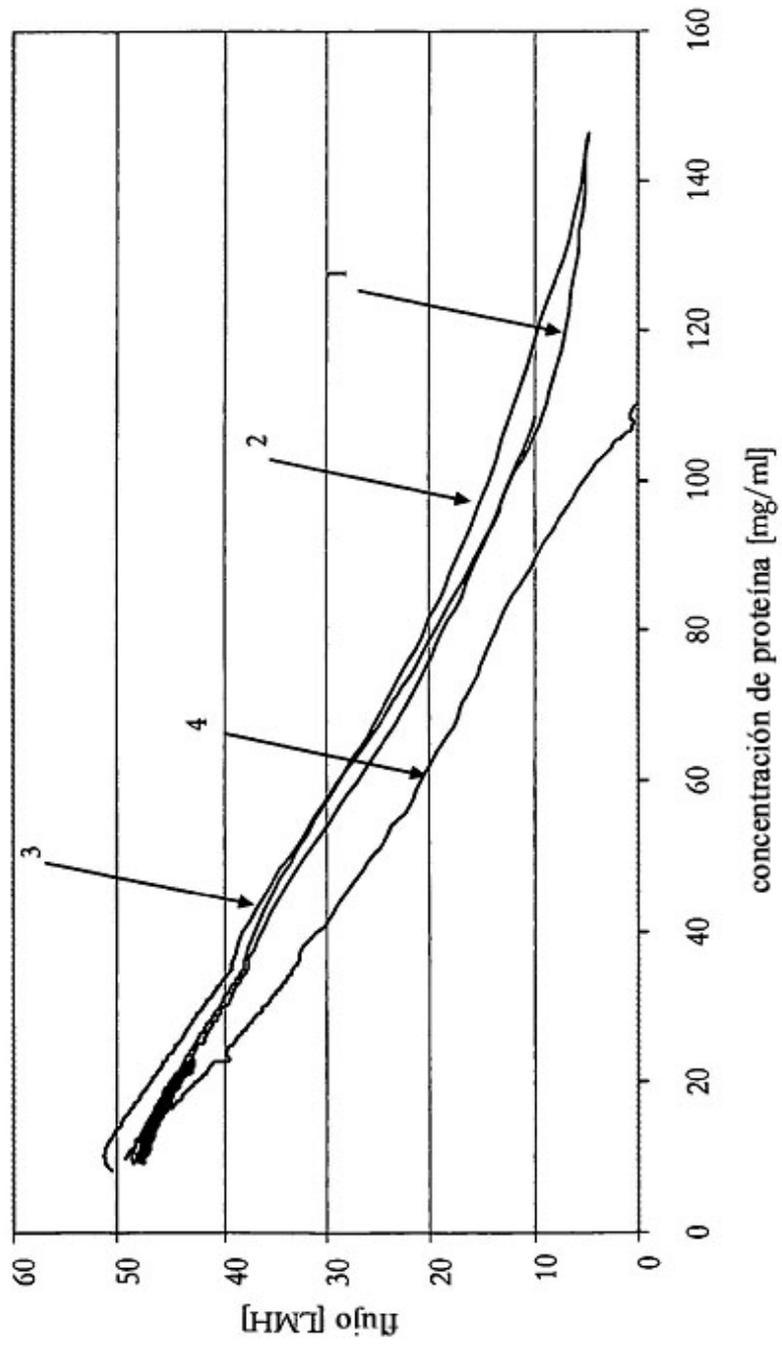
La solución concentrada obtenida según el método del Ejemplo 2 se filtró después de la filtración de flujo tangencial con una presión de 0,75 bar a través de una membrana Durapore (PVDF, Millipore GmbH, Schwalbach, Alemania) (área de filtro de 4,52 cm<sup>2</sup>).

Se encontró que la filtrabilidad de soluciones de inmunoglobulina altamente concentradas depende del método de concentración utilizado. Se ha encontrado además que la solución concentrada de inmunoglobulina obtenida con el método variable según la invención muestra un declive reducido del flujo de filtración en comparación con otros métodos fijos (figura 15).

**REIVINDICACIONES**

1. Método para concentrar una solución de inmunoglobulina mediante filtración de flujo tangencial, caracterizado porque la presión transmembranal y el flujo transversal son variables y se modifican durante el procedimiento de filtración según la concentración de inmunoglobulina, con:
- a) presión transmembranal de entre 1,4 bar y 1,6 bar y un flujo transversal de entre 75 ml/min y 90 ml/min en un intervalo de concentraciones de hasta 30 mg de inmunoglobulina por ml de solución que debe concentrarse,
  - b) presión transmembranal de entre 0,8 bar y 0,9 bar y un flujo transversal de entre 140 ml/min y 160 ml/min en un intervalo de concentraciones de entre 15 mg/ml y 55 mg/ml,
  - c) presión transmembranal de entre 0,8 bar y 0,9 bar y un flujo transversal de entre 120 ml/min y 140 ml/min en un intervalo de concentraciones de entre 50 mg/ml y 275 mg/ml,
- en el que la concentración real de la inmunoglobulina en la solución que debe concentrarse determina la presión transmembranal aplicada y el flujo cruzado, y se ajustan la presión transmembranal y el flujo transversal según la concentración real de la inmunoglobulina.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la presión transmembranal y el flujo transversal son: -1,5 bar y 80 ml/min. en la etapa a), - 0,85 bar y 150 ml/min. en la etapa b) y/o - 0,85 bar y 130 ml/min en la etapa c).
3. Método para producir una inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero, que comprende las etapas siguientes:
- a) proporcionar una célula de mamífero recombinante que comprende uno o más ácidos nucleicos codificantes de una inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero,
  - b) cultivar dicha célula bajo condiciones adecuadas para la expresión de la inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero,
  - c) recuperar la inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero, a partir de la célula de mamífero recombinante o del medio de cultivo,
  - d) concentrar la solución acuosa tamponada obtenida, que comprende la inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero utilizando una filtración de flujo tangencial con presión transmembranal y flujo transversal variables según la reivindicación 1.
4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque comprende, antes o después de la etapa d), la etapa siguiente:
- e) purificar la solución acuosa tamponada que contiene la inmunoglobulina, la cual no es producida naturalmente por una célula de mamífero.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero es una inmunoglobulina completa, o un fragmento de inmunoglobulina, o un conjugado de inmunoglobulina.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado porque la célula de mamífero es una célula CHO, una célula BHK, una célula HEK, una célula Sp2/0 o una célula PER.C6®.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha filtración de flujo tangencial utiliza una membrana con un valor de corte comprendido en el intervalo de entre 20 y 50 kDa de peso molecular.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha solución de inmunoglobulina presenta un valor de pH de entre 3,0 y 10,0.
9. Método según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho valor de pH se encuentra comprendido entre 3,0 y 7,0.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la presión transmembranal y el flujo transversal pueden modificarse a cualquier valor de concentración en los intervalos de concentración solapantes.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el intervalo de concentraciones en la etapa a) es de entre 5 y 25 mg/ml, en la etapa b) es de entre 25 y 50 mg/ml y en la etapa c) es de entre 50 y 140 mg/ml.

Fig. 1



**Fig. 2**

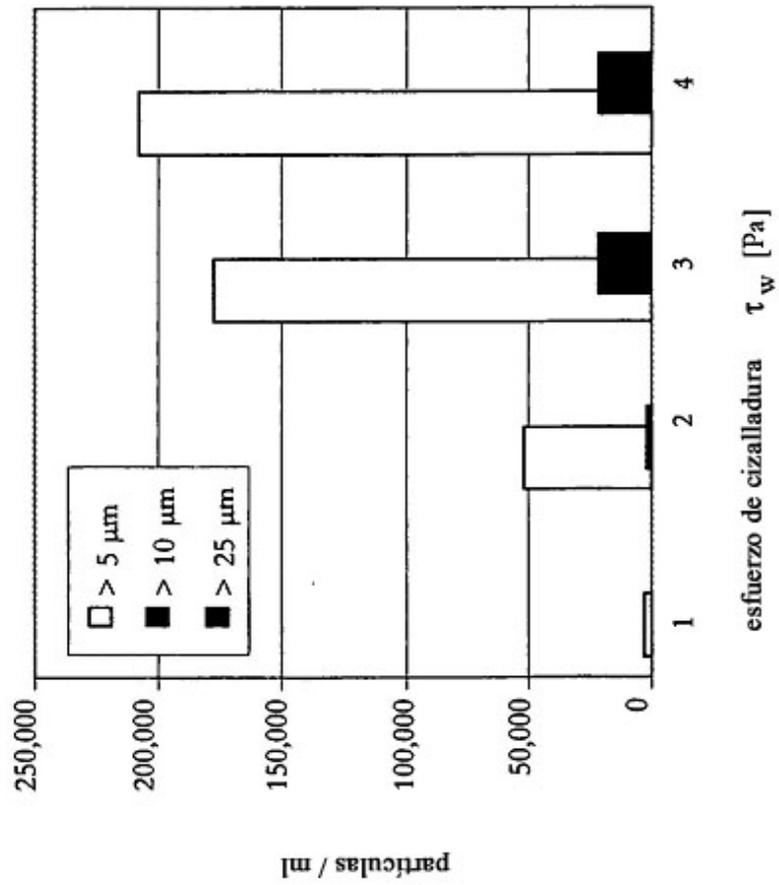


Fig. 3

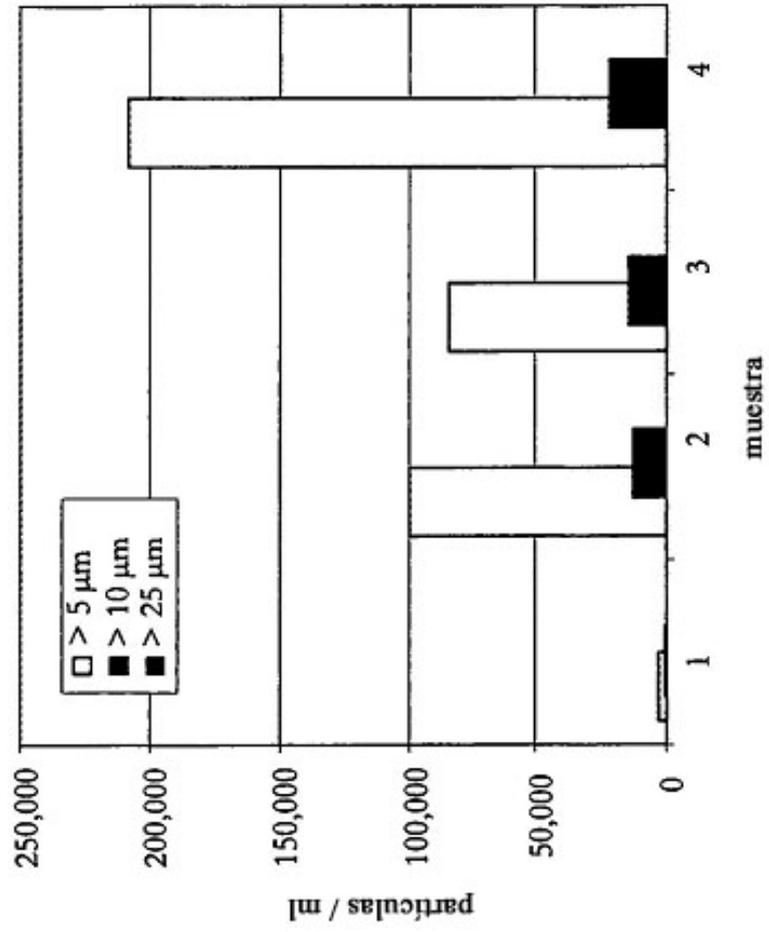


Fig. 4

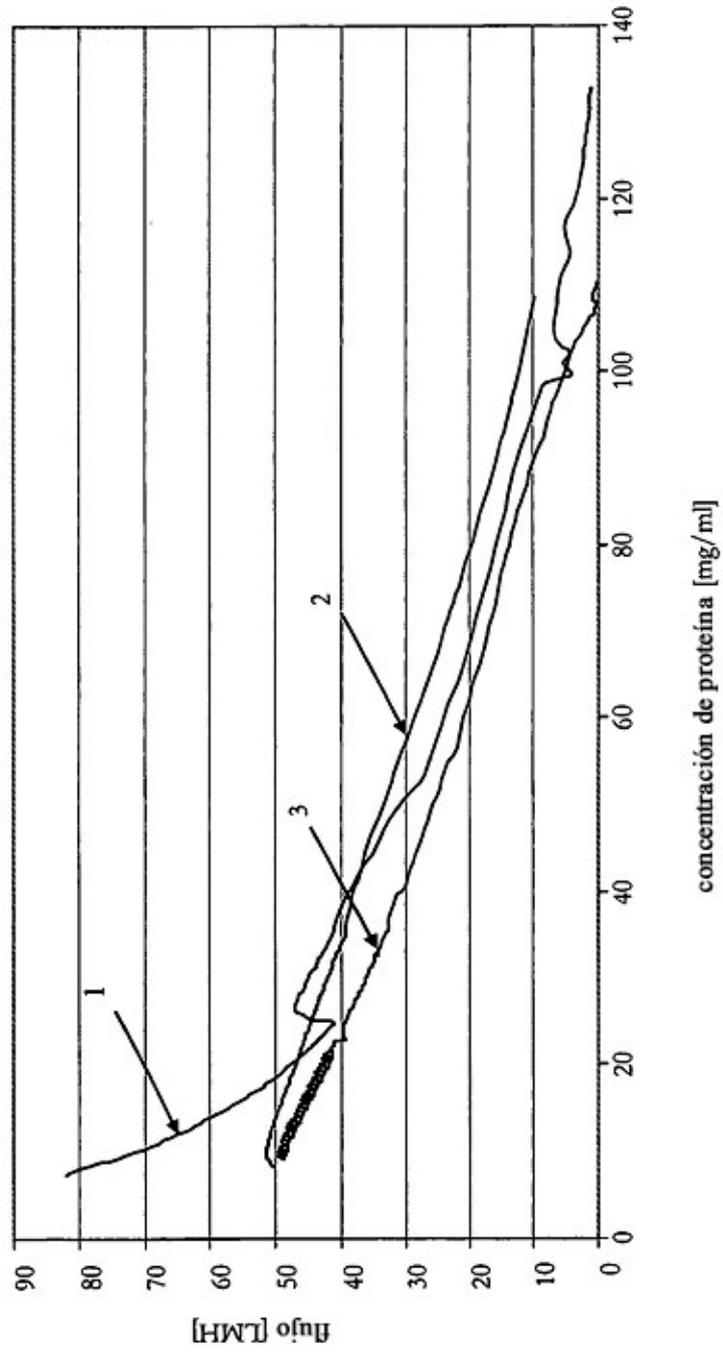
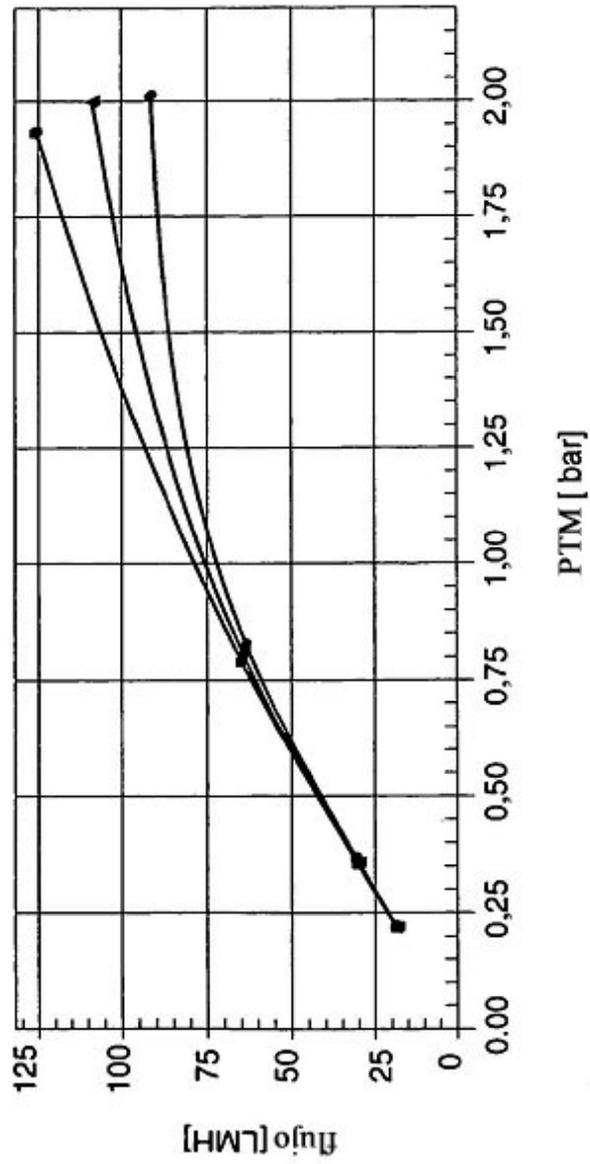
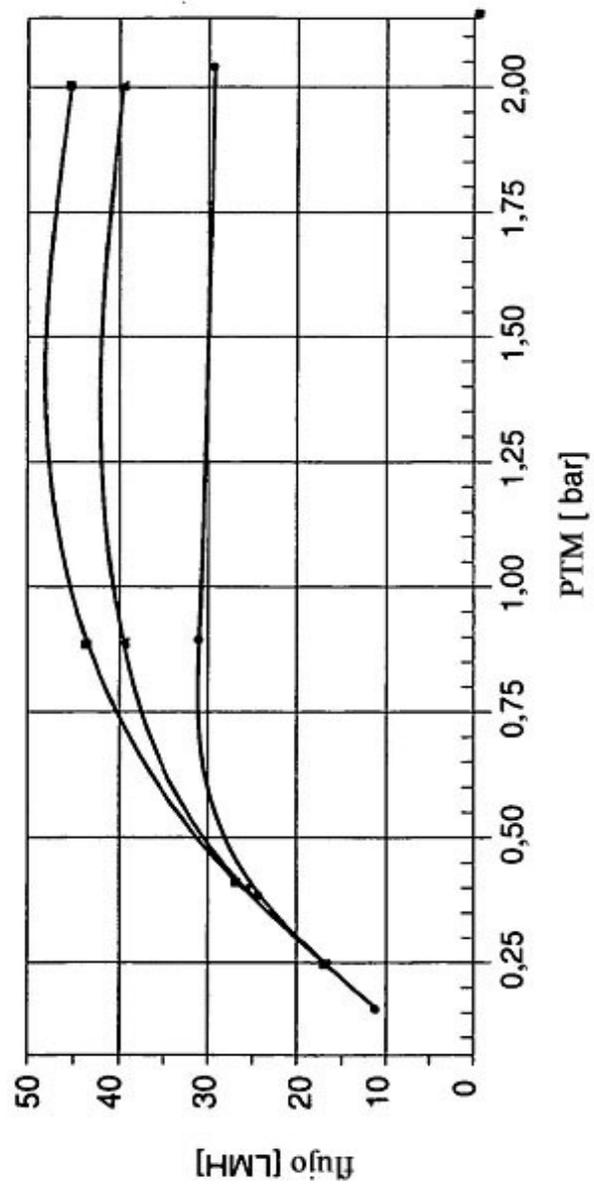


Fig. 5



**Fig. 6**



**Fig. 7**

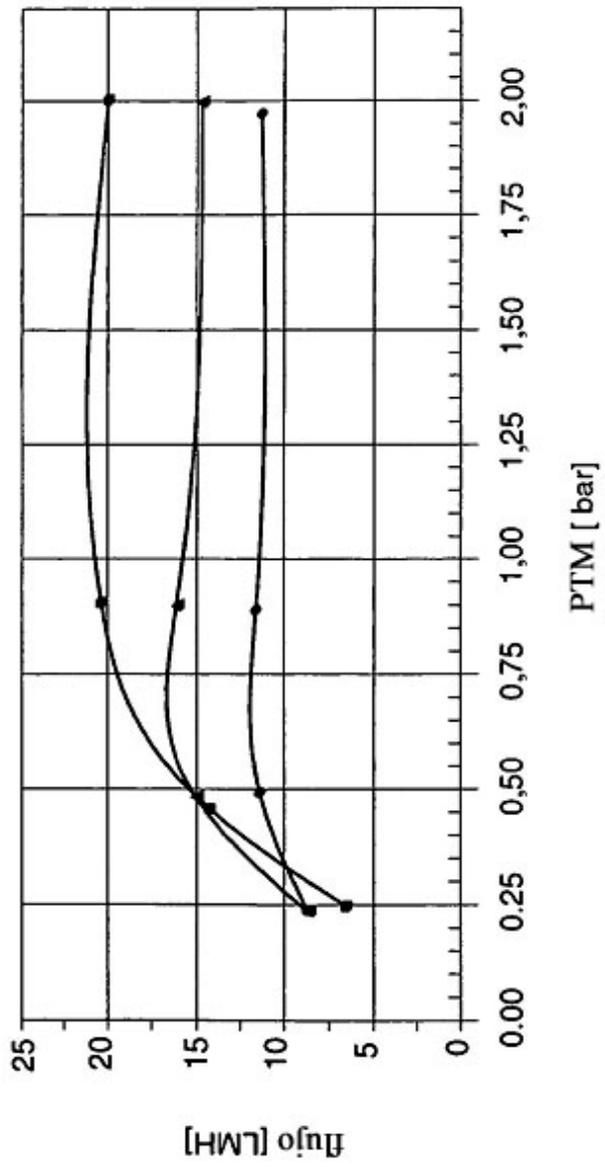


Fig. 8

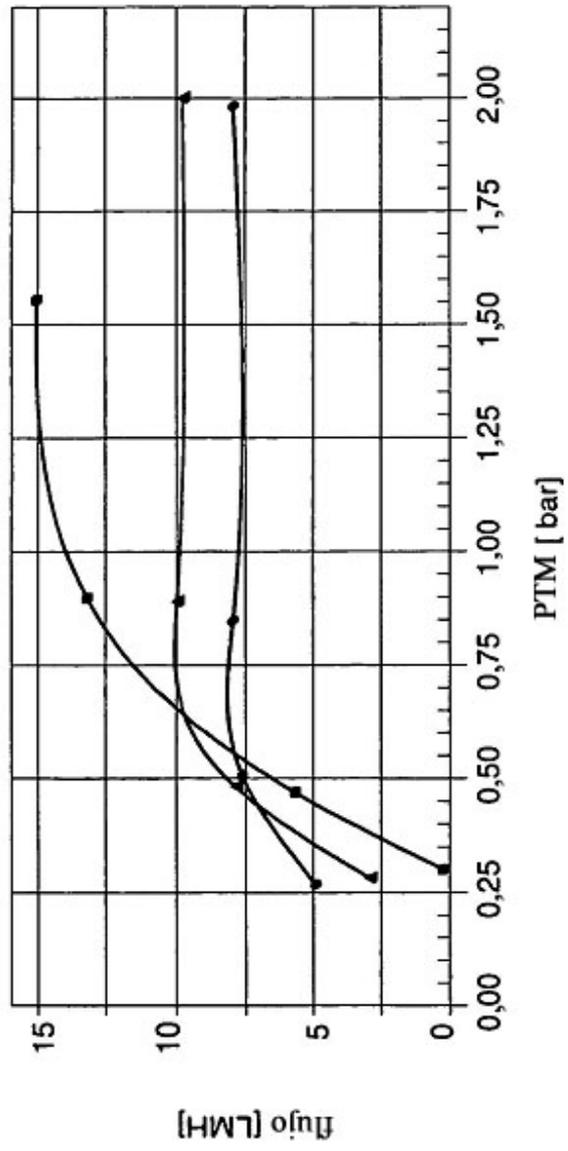


Fig. 9

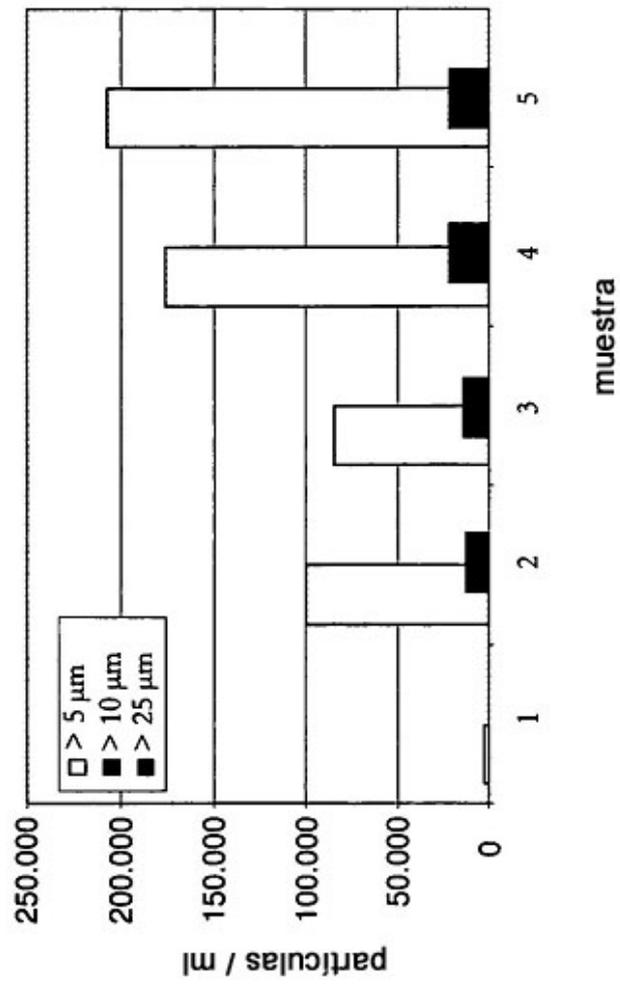
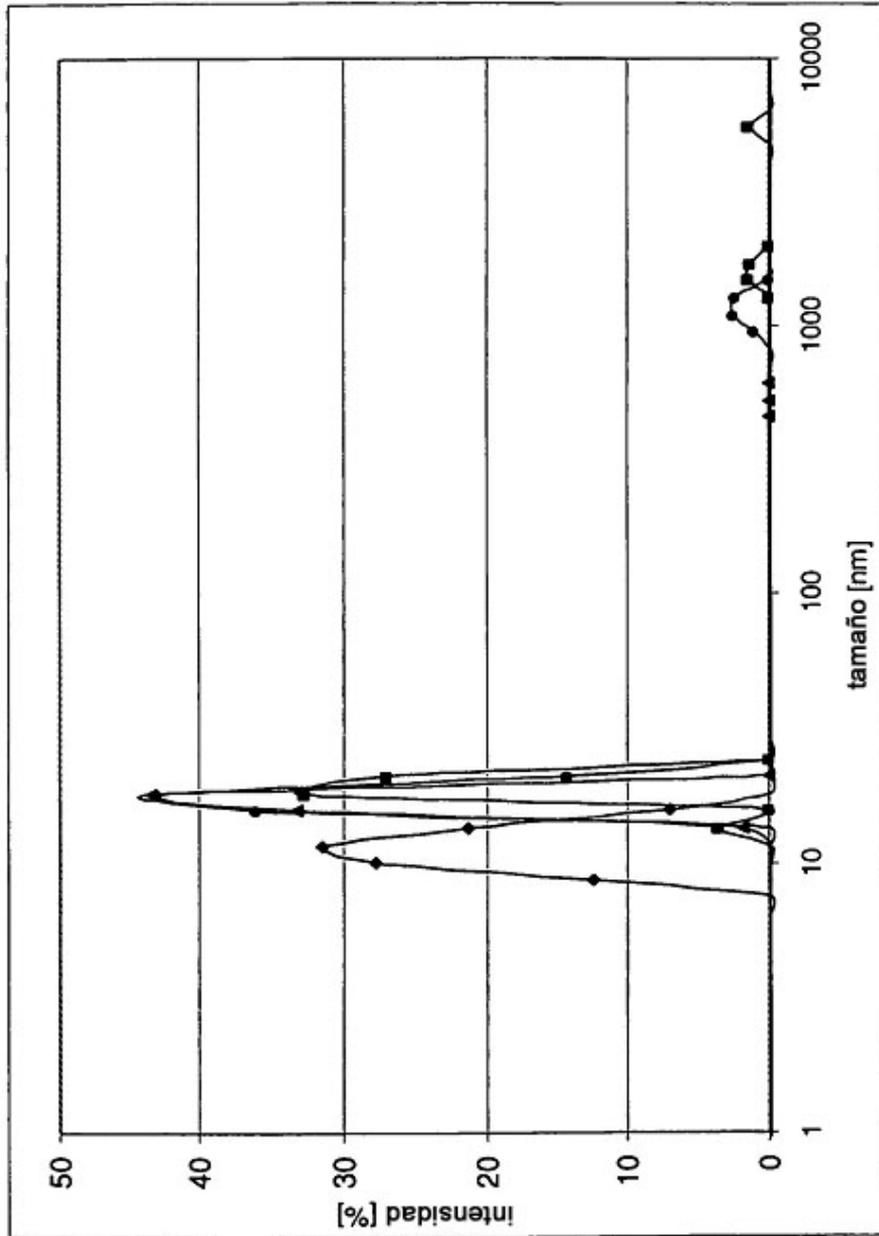
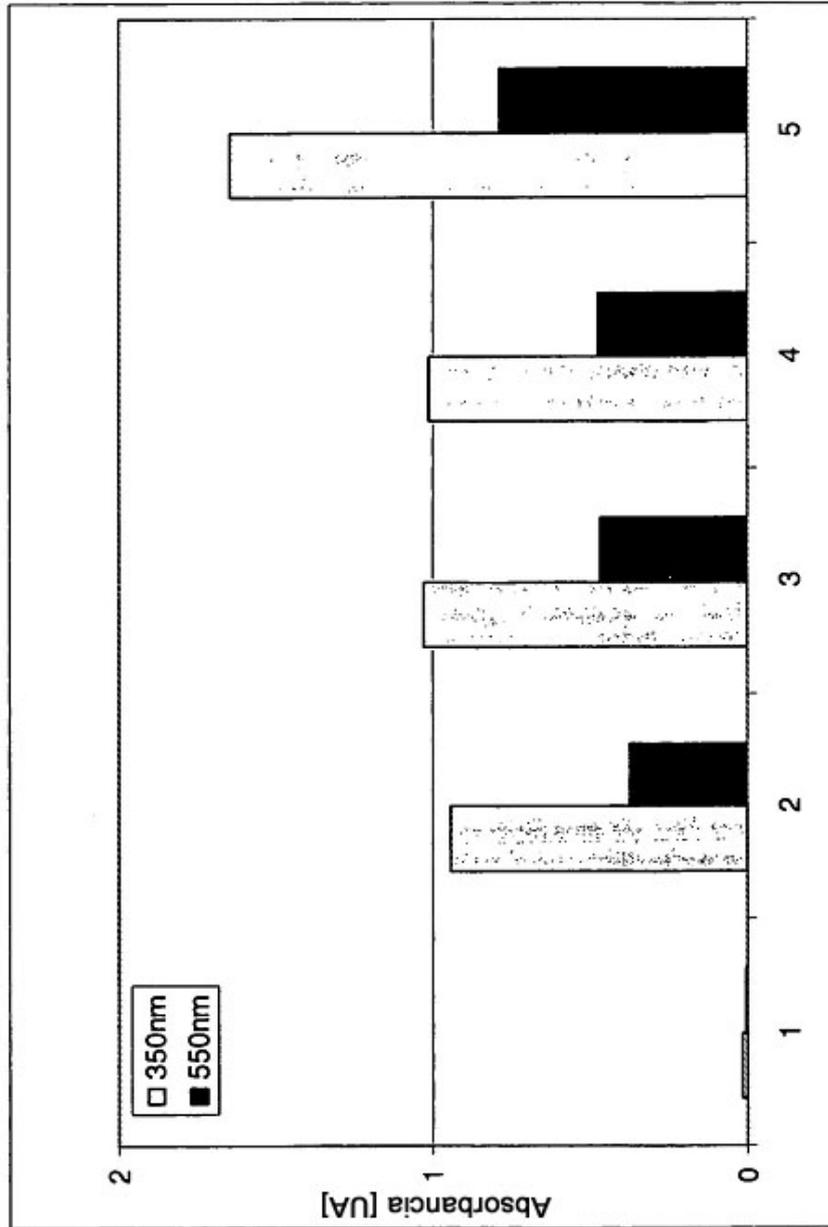


Fig. 10



**Fig. 11**



**Fig. 12**

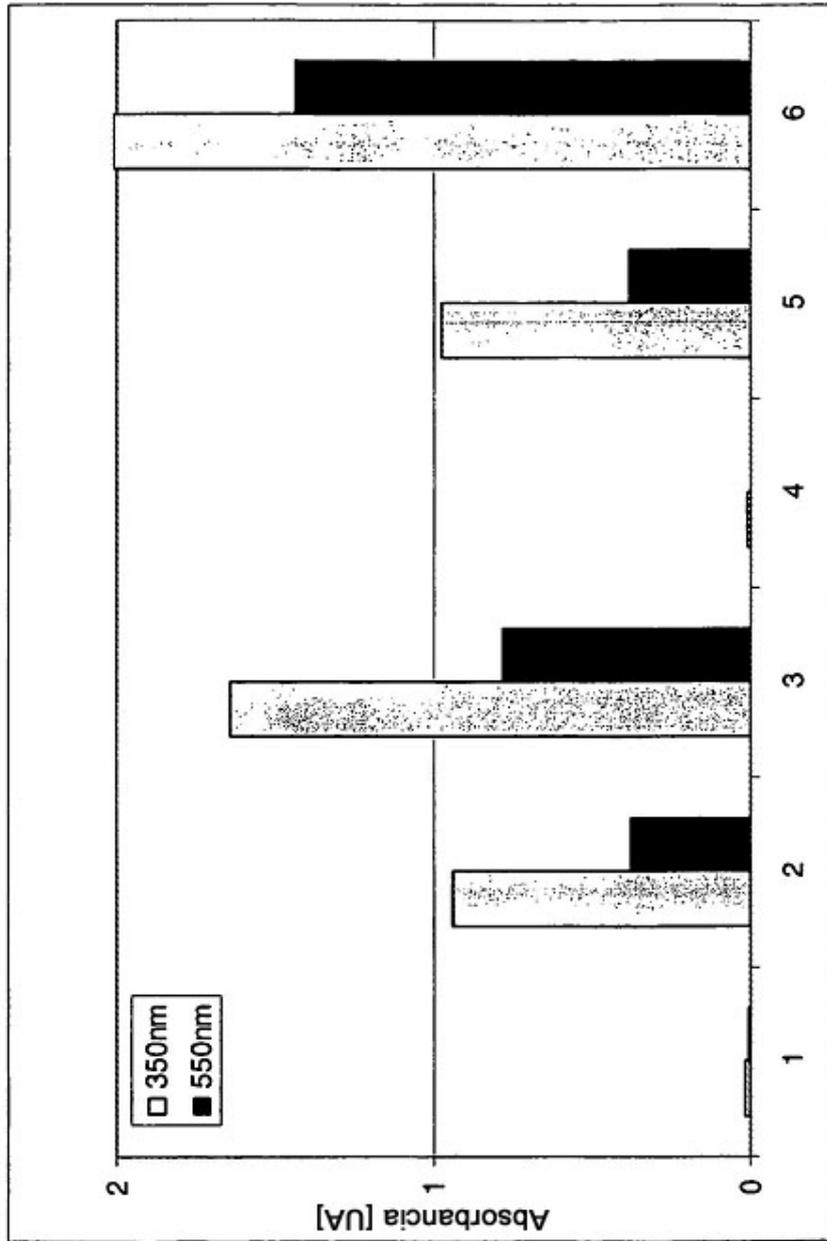
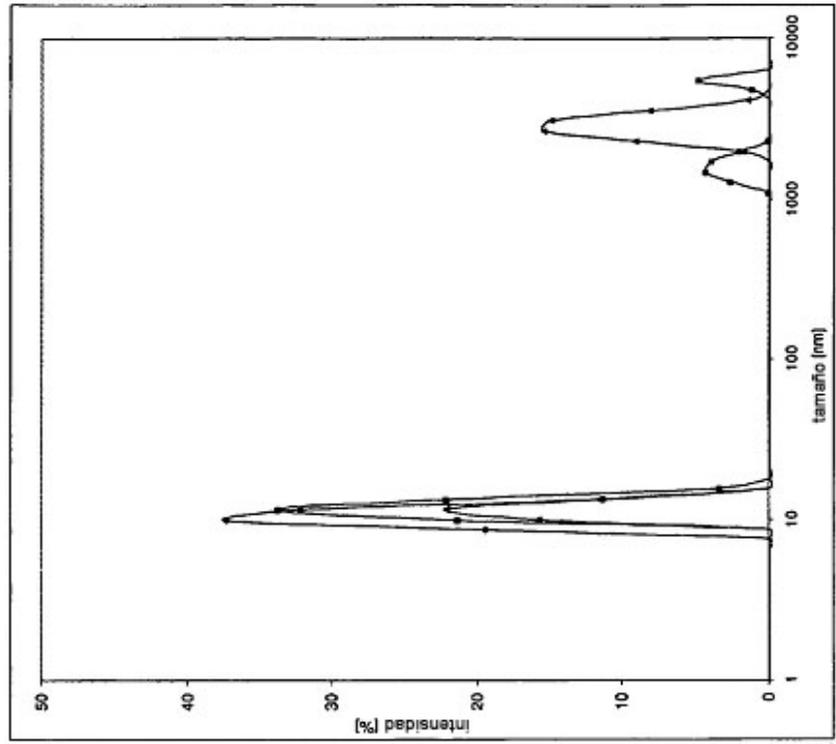
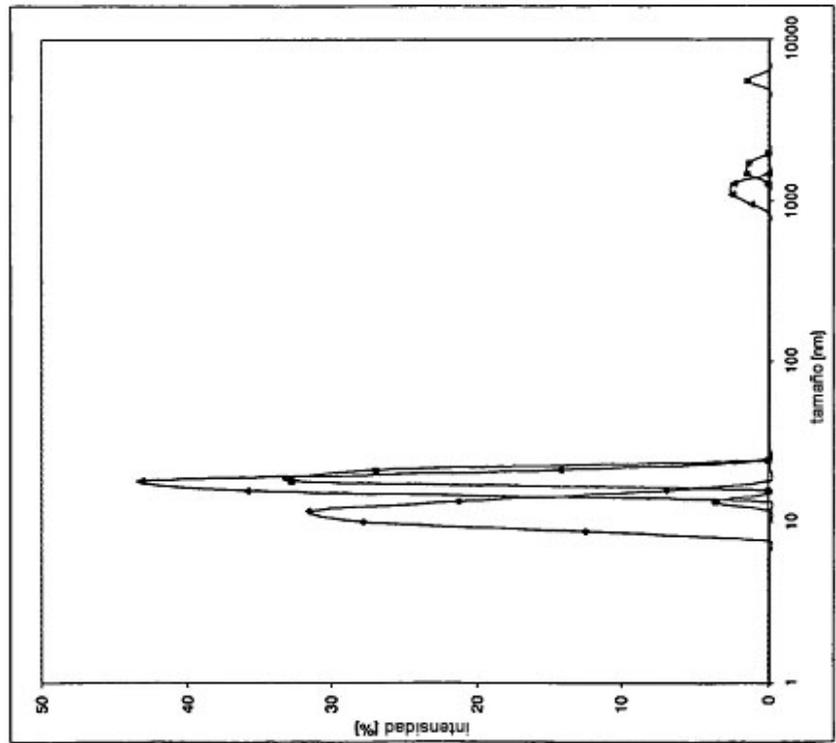


Fig. 13

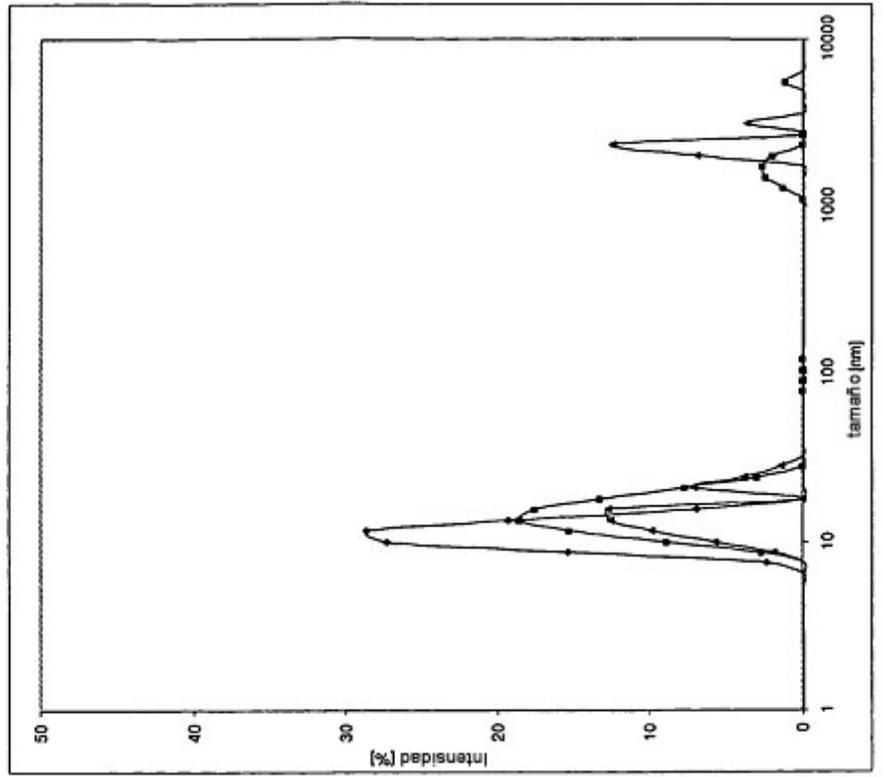


b)

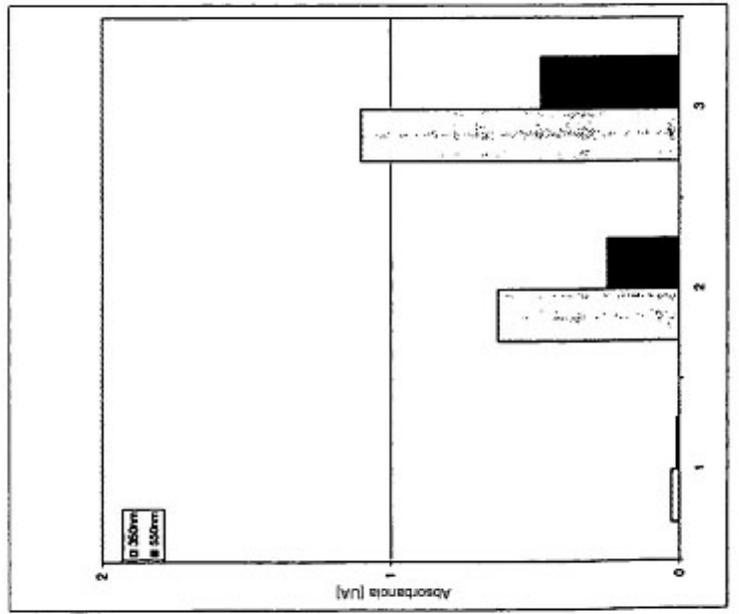


a)

Fig. 14



b)



a)

Fig. 15

