

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 029**

51 Int. Cl.:

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

A61M 1/02 (2006.01)

A61M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2009 E 09731947 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 2271382**

54 Título: **Ultrafiltración/diafiltración en dos fases**

30 Prioridad:

26.11.2008 US 118001

15.04.2008 US 45233

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

05.06.2013

73 Titular/es:

**GRIFOLS THERAPEUTICS INC. (100.0%)
4101 Research Commons, 79 T.W. Alexander
Drive
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**GONZALEZ, MARTIN;
WOOD, WOODY y
EARP, FRED H.**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 406 029 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

Ultrafiltración/diafiltración en dos fases

5 **SECTOR DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a métodos para preparar una formulación de proteína concentrada y composiciones que comprenden dicho preparado, en particular se refiere a métodos para preparar una formulación de un producto del plasma concentrado, en particular se refiere a métodos de preparación y composiciones que comprenden IgG concentrada.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Habitualmente, se utiliza únicamente un tipo de membrana de ultrafiltración para conseguir concentraciones finales de productos de plasma para formulación. La investigación ha demostrado que la ultrafiltración con cassette puede producir concentraciones más elevadas. Sin embargo, debido a la viscosidad más elevada y la concentración elevada de proteína, la recuperación del producto se reduce ampliamente a medida que la membrana tiende a obstruirse o a presentar incrustaciones. Los estudios también han demostrado que centrándose en concentraciones elevadas se evita la recuperación de la membrana después de la limpieza.

Por consiguiente, sería deseable dar a conocer un método para concentrar un producto del plasma para conseguir concentraciones finales más elevadas, a la vez que se minimiza la pérdida de rendimiento y el impacto en el tiempo de procesado.

25 **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

En un aspecto, la presente invención da a conocer un método para concentrar una proteína de una solución que comprende la proteína. El método comprende:

- 30 a) ultrafiltrar la solución utilizando una primera membrana para formar una primera solución de fracción retenida que comprende la proteína a una primera concentración, en el que la primera membrana tiene un corte de peso molecular suficiente para retener, como mínimo, una parte de la proteína presente en la solución;
- 35 b) diafiltrar la primera solución de fracción retenida con una solución acuosa utilizando la primera membrana para formar una segunda solución de fracción retenida que comprende la proteína a aproximadamente la primera concentración;
- c) formular la segunda retención que comprende la proteína diafiltrada con glicina y ajustar el pH; y
- 40 d) ultrafiltrar la segunda solución de fracción retenida utilizando una segunda membrana para formar una solución final de fracción retenida que comprende la proteína a una segunda concentración, en el que la segunda membrana tiene un corte de peso molecular de aproximadamente dos veces el corte de peso molecular de la primera membrana, en el que la segunda concentración es superior a la primera concentración.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un método para concentrar una proteína de una solución que comprende la proteína. El método comprende:

- 45 a) ultrafiltrar la solución utilizando una primera membrana para formar una primera solución de fracción retenida que comprende el producto del plasma a una primera concentración aproximadamente del 5%, en el que la primera membrana tiene un corte de peso molecular suficiente para retener, como mínimo, aproximadamente el 90% del producto del plasma;
- 50 b) diafiltrar la primera solución de fracción retenida utilizando la primera membrana con agua para formar una segunda solución de fracción retenida que comprende el producto del plasma a aproximadamente la primera concentración;
- c) formular aproximadamente el 5% del producto de plasma diafiltrado de la etapa b) en glicina de aproximadamente 0,16 a aproximadamente 0,30 M, en el que la formulación comprende además ajustar el pH hasta aproximadamente 4,3; y
- 55 d) ultrafiltrar la segunda solución de fracción retenida utilizando una segunda membrana para formar una solución final de fracción retenida que comprende el producto del plasma a una segunda concentración de aproximadamente el 19% a aproximadamente el 21%, en el que la segunda membrana tiene un corte de peso molecular de aproximadamente dos veces el corte de peso molecular de la primera membrana, en el que la segunda concentración es superior a la primera concentración.

60 **DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS**

La figura 1 es un ejemplo que ilustra algunas realizaciones de diagrama de flujo del proceso que representa de

manera esquemática un método de ultrafiltración/diafiltración de dos fases para producir una formulación con una concentración elevada de IgG. A, esquema basado en cromatografía de intercambio iónico; y B, esquema basado en el tratamiento con disolvente/detergente (D/D).

La figura 2 muestra la viscosidad de una solución de proteína en función de la concentración de sal.

La figura 3 muestra la viscosidad de una solución de proteína en función de la concentración de proteína.

La figura 4 muestra la viscosidad de una solución de proteína en función de la temperatura.

La figura 5 muestra la viscosidad de una solución de proteína en función de la concentración de proteína.

La figura 6 muestra la viscosidad de una solución de proteína en función del pH para varios tiempos.

La figura 7 muestra el grado de formación de agregado en función del tiempo para varias concentraciones de proteína.

La figura 8 muestra el cambio en la formación de agregados en función del pH para varios tiempos.

La figura 9 muestra la formación de dímeros en función del pH para varios tiempos.

La figura 10 muestra la fragmentación de una proteína en función del pH para varios tiempos.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Según la presente invención, de manera sorprendente, se ha descubierto que una estrategia de ultrafiltración/diafiltración progresiva de dos fases para concentrar una proteína puede proporcionar composiciones que comprenden la proteína concentrada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención da a conocer un concepto nuevo de concentración para conseguir una formulación de un producto del plasma final de concentración más elevada que puede ser adecuada para utilizaciones terapéuticas o profilácticas y/o la administración mediante un conjunto de métodos, que incluyen inyecciones subcutáneas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "proteína" pretende incluir cualquier polipéptido recombinante o purificado, que incluye, aunque sin limitarse a éstos, un polipéptido natural, modificado o sintetizado, y multímeros, fragmentos (por ejemplo, un fragmento biológicamente activo), o variantes de los mismos.

La proteína puede derivar de un ser humano o un ser no humano, que incluyen, aunque sin limitarse a éstos, perros, gatos, cerdos, caballos, vacas, pájaros, peces, anfibios, reptiles, transgénicos, etc.

El término "fragmento biológicamente activo" se refiere a un fragmento de una proteína que retiene, como mínimo, una de las funciones de la proteína de la que deriva. Por ejemplo, un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo incluye un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo; un fragmento biológicamente activo de un receptor incluye un fragmento del receptor que aún puede unir su ligando; un fragmento biológicamente activo de un ligando incluye la parte de un ligando que aún se puede unir a su receptor; y un fragmento biológicamente activo de una enzima incluye la parte de la enzima que aún puede catalizar una reacción catalizada por la enzima de longitud completa.

En una realización, la proteína es un producto del plasma.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "producto del plasma" se refiere a una proteína que se puede caracterizar, en general, como un componente de la sangre o fracción de la sangre de un ser humano o un ser no humano. Por ejemplo, la fracción de γ -globulina de la sangre comprende proteínas, tales como inmunoglobulinas y proteína C reactiva. La fracción de α 1-globulina contiene proteínas, tales como la α 1-glicoproteína ácida, α 1-antitripsina, y α 1-lipoproteína. La fracción de α 2-globulina contiene proteínas, tales como α 2-macroglobulina, haptoglobulina, ceruloplasmina y un complemento específico de grupo. La fracción de β -globulina contiene proteínas, tales como transferrina, hemopexina, β 1-lipoproteína, β 2-microglobulina y componentes de complemento.

En algunas realizaciones, la proteína a concentrar es un anticuerpo. El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, incluye, aunque sin limitarse a éstos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, composiciones de anticuerpos con especificidades de poliepitopo, anticuerpos biespecíficos y diacuerpos ("diabodies"). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos, por ejemplo, de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgA, IgE, IgM, IgD), o fragmento de unión a antígeno de los mismos. En general, un fragmento de anticuerpo comprende la región de unión a antígeno y/o la región variable de un anticuerpo intacto. De este modo, el término fragmento de anticuerpo incluye segmentos de partes separadas de manera proteolítica o preparadas de manera recombinante de una molécula de anticuerpo que se une o se puede unir de manera selectiva a una proteína seleccionada. Entre los ejemplos no limitantes de dichos fragmentos proteolíticos y/o recombinantes se incluyen Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, y anticuerpos monocatenarios (scFv) que contienen un dominio V[L] y/o V[H] unido por un péptido enlazador. Los scFv se pueden unir de manera covalente o no covalente para formar anticuerpos que tienen dos o más sitios de unión.

Las inmunoglobulinas se pueden preparar a partir del plasma de donantes normales no seleccionados, mientras que

las hiperinmunoglobulinas se pueden preparar a partir del plasma de donantes con títulos de anticuerpo contra antígenos específicos. Estos donantes hiperinmunes se pueden identificar durante los periodos convalecientes después de la infección o transfusión, o se pueden inmunizar específicamente para producir los anticuerpos deseados.

5 En algunas realizaciones, el producto del plasma es una inmunoglobulina G (IgG). En la patente de Estados Unidos No. 5.886.154 de Lebing y otros, se da a conocer un proceso para la purificación de anticuerpos de origen humano u otros orígenes.

10 Además de albúmina e inmunoglobulinas, las lipoproteínas son otra clase de componentes de la sangre. Por ejemplo, en la sangre humana se pueden distinguir tres clases de lipoproteínas, α 1-lipoproteína, pre- β -lipoproteína y β 1-lipoproteína, por ejemplo, según su comportamiento electroforético. Entre las apolipoproteínas, que son los componentes proteicos de las lipoproteínas, se incluyen las apolipoproteínas A-1, A-2, A-4, B-48, B-100, C, D, y E.

15 Un conjunto de proteínas de la sangre funcionan como portadoras, incluyendo aquellas que transportan iones de metales, tales como la proteína de unión a hierro, la transferrina, la proteína de unión a cobre, la ceruloplasmina, y la 9.5 S- α 1-glicoproteína. La prealbúmina y la globulina de unión a tirosina transportan la hormona de la tiroides y la transcortina transporta las hormonas esteroideas. La hemoglobina se elimina de la circulación por la haptoglobina y el grupo hemo se une a la hemopexina. La globulina de unión a retinol se une a la vitamina A. Las transcobalaminas I, II, y III se unen a la vitamina B12. La Go-globulina se une a las vitaminas D2 y D3.

20 Un conjunto de las proteínas de la sangre son enzimas, proenzimas o inhibidores de enzimas. Entre las proteínas de la sangre que son enzimas (por ejemplo, proteinasas) se incluyen, por ejemplo, la colinesterasa, la ceruloplasmina, el plasminógeno, la proteína C y la β 2-glicoproteína I. Las proenzimas (es decir, zimógenos) se convierten en enzimas mediante la acción de enzimas específicas. Los inhibidores de proteinasas controlan este proceso mediante la reducción o eliminación de la actividad de estas enzimas específicas. El inhibidor de proteinasas principal hallado en la sangre humana es la α 1-antitripsina (es decir, e inhibidor de la α 1-proteína; el inhibidor de la α 1-tripsina, prolastina) que protege los tejidos de la digestión mediante la elastasa. Otra clase de inhibidores de proteinasas hallados en la sangre humana son las antitrombinas, tales como la antitrombina III, que evitan los efectos de la trombina. Otro inhibidor de proteinasas hallado en la sangre humana es el inhibidor de la C1-esterasa, que reduce o elimina la actividad de la C1-esterasa, que es el primer componente activado del complemento, C1. Entre otras proteínas de la sangre que son inhibidores de enzimas se incluyen la α 1-antiquimiotripsina, el inhibidor de la inter- α -tripsina, la α 2-macroglobulina y la α 2-antiplasmina.

35 Algunas proteínas de la sangre están implicadas en el proceso de coagulación (es decir, factores de coagulación). Los coágulos de sangre se forman mediante una cascada enzimática, catalizando la forma activada de un factor la activación del siguiente factor, lo cual da lugar a una amplificación amplia y una respuesta rápida a la lesión. Entre los ejemplos de factores de coagulación desactivados y activados se incluyen, por ejemplo, XII y XIIa; XI y XIa; IX y IXa; X y Xa; VII y VIIa; II (protrombina) y la (trombina); I (fibrinógeno) y la (fibrina). Entre otros factores de coagulación se incluyen el quininógeno, la calicreína y los factores VIII, VIIIa, V, Va, XIII, y XIIIa. Un conjunto de factores de coagulación también son referidos como proteínas dependientes de la vitamina K, que incluyen, por ejemplo, el Factor II (protrombina), el Factor VII, el Factor IX, el Factor X, la Proteína C, y la Proteína S.

45 Algunas de las proteínas de la sangre son componentes del complemento y juntas comprenden el sistema del complemento, que lisa microorganismos y células infectadas mediante la formación de huecos en su membrana plasmática. Se conocen más de 15 proteínas de complemento, que incluyen C1, Clq, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 y C9.

50 Entre los ejemplos de glicoproteínas que se pueden purificar a partir de sangre humana se incluyen la α 1-glicoproteína ácida, la α 2-glicoproteína, la α 2-macroglobulina, la α 2-HS-glicoproteína, la α 1-antiquimiotripsina, la α 1-antitripsina, el fibrinógeno, la fibronectina, la pre-albúmina, la hemopexina, la haptoglobina, la transferrina, la ceruloplasmina, muchos factores de coagulación, y muchos componentes del sistema del complemento.

55 En un aspecto, la presente invención da a conocer un método para concentrar una proteína de una solución que comprende la proteína. El método comprende las siguientes etapas:

- a) ultrafiltrar la solución utilizando una primera membrana para formar una primera solución de fracción retenida que comprende la proteína a una primera concentración, en el que la primera membrana tiene un corte de peso molecular suficiente para retener, como mínimo, una parte de la proteína presente en la solución;
- 60 b) diafiltrar la primera solución de fracción retenida con una solución acuosa utilizando la primera membrana para formar una segunda solución de fracción retenida que comprende la proteína a aproximadamente la primera concentración;

- c) formular la segunda retención que comprende la proteína diafiltrada con glicina y ajustar el pH; y
 d) ultrafiltrar la segunda solución de fracción retenida utilizando una segunda membrana para formar una solución final de fracción retenida que comprende la proteína a una segunda concentración, en el que la segunda membrana tiene un corte de peso molecular de aproximadamente dos veces el corte de peso molecular de la primera membrana, en el que la segunda concentración es superior a la primera concentración.

En una realización, la primera concentración es, como mínimo, aproximadamente el 1% en proteína (p/v), de manera ilustrativa, aproximadamente del 1% a aproximadamente el 15%, aproximadamente del 2% a aproximadamente el 12%, aproximadamente del 3% a aproximadamente el 10%, aproximadamente del 4% a aproximadamente el 8%, y aproximadamente del 5% a aproximadamente el 6% en proteína (p/v). En otra realización, la primera concentración es aproximadamente el 5% en proteína (p/v).

En una realización, la primera membrana tiene un corte de peso molecular suficiente para retener, como mínimo, el 90% de la proteína presente en la solución.

En otra realización, la solución acuosa es agua fría para inyección (CWFI).

En otras realizaciones, en la etapa c), la proteína diafiltrada se formula en glicina aproximadamente de 0,16 a aproximadamente 0,30 M y el pH se ajusta a aproximadamente 4,3.

En una realización, la segunda concentración es aproximadamente del 19% a aproximadamente el 21%.

En algunas realizaciones, la proteína es IgG.

I. La solución

La solución que comprende la proteína puede ser una solución que contiene la proteína diluida, en la que la proteína contenida en la solución se concentra antes de utilizarse en aplicaciones posteriores. Por ejemplo, después de la concentración de la proteína, según la presente invención, la solución final de fracción retenida que comprende la proteína concentrada se puede utilizar para preparar formulaciones adecuadas para disponer de una inyección (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intravenosa) de la proteína a un sujeto (por ejemplo, un ser humano o un ser no humano, que incluye, aunque sin limitarse a éstos, perros, gatos, cerdos, caballos, vacas, pájaros, peces, anfibios, reptiles, etc.). De manera preferente, la solución que comprende la proteína a concentrar es un producto, como mínimo, de un esquema de purificación anterior que produce la solución (por ejemplo, una solución que contiene proteína diluida) que presenta un nivel deseado de pureza de proteína y de eliminación viral. En una realización, la pureza de la proteína de la solución es, como mínimo, aproximadamente del 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, o más.

En algunas realizaciones, la solución que comprende la proteína a concentrar es un eluato o un producto del paso del flujo de una cromatografía de un material de partida que comprende la proteína.

Por ejemplo, las técnicas de cromatografía para purificar un producto del plasma son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, el intercambio aniónico), cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmutofinidad y cromatografía de exclusión de tamaño. El material de partida puede ser una fracción del plasma precipitada con alcohol/pH, tal como, por ejemplo, una fracción de Cohn, que es conocida por un experto en la materia. De manera preferente, la fracción de Cohn es la Fracción II + III, o una fracción obtenida mediante el subfraccionamiento de II+III (por ejemplo, la Fracción II). El origen del material de partida puede ser cualquier origen que comprenda el producto del plasma, que incluye, aunque sin limitarse a éstos, fluido ascítico, medios de cultivo de tejidos que contienen el producto del plasma, fracciones del plasma humano y fracciones de plasma animal.

En una realización, la solución que comprende la proteína a concentrar se obtiene después de la cromatografía de intercambio aniónico del material de partida. En otra realización, se utilizan varias combinaciones de resinas de intercambio aniónico dependiendo de la selectividad de las resinas. Por ejemplo, las resinas de intercambio aniónico se pueden elegir por su capacidad de eliminar de manera selectiva las impurezas halladas en el material de partida (por ejemplo, una fracción del plasma precipitada con alcohol/pH) que comprende un producto del plasma. En una realización, la fracción del plasma precipitada con alcohol/pH es la Fracción de Cohn II+III o la pasta de la Fracción II.

En una realización, el material de partida comprende el producto IgG del plasma. De manera preferente, el material de partida (por ejemplo, la pasta de la Fracción II + III) que comprende la IgG a purificar se pasa a través de dos columnas de cromatografía de intercambio aniónico unidas en serie (por ejemplo, combinaciones de las resinas Q y ANX de Pharmacia Biotech y/o Fractogel TMAE de E. Merck) para disponer de la solución que comprende el

5 producto del plasma. Los intercambiadores aniónicos se pueden elegir por su capacidad para eliminar IgA, IgM, albúmina y otras impurezas de proteínas restantes del material de partida. Después de la carga, las columnas se pueden lavar con tampón de equilibrio. Las fracciones del paso de flujo y del lavado se pueden recoger como IgG purificada. Ambas columnas se pueden equilibrar con el mismo tampón y al mismo pH. Antes de la cromatografía, el material de partida se puede someter a otros procesos.

10 La cromatografía de intercambio iónico aprovecha la distribución en la superficie y la densidad de carga en la proteína y el medio de intercambio iónico. Sin estar sometido a ninguna teoría concreta, se cree que la resina de intercambio aniónico presenta una superficie cargada positivamente. La densidad de carga es específica para la resina y, en general, es independiente del pH (en el intervalo de trabajo de la resina). Un intercambiador aniónico habitual se unirá a proteínas que tienen una carga neta negativa (es decir, cuando el pH de la solución está por encima del punto isoeléctrico de la proteína). En realidad, la superficie de una proteína no presenta una carga única; en cambio, es un mosaico de cargas positivas, negativas y neutras. La estructura de la superficie es específica para una proteína determinada y está afectada por las condiciones de la solución, tal como la fuerza iónica y el pH. Esta singularidad se puede explotar para establecer condiciones específicas en las que proteínas individuales se unirán o liberarán de la resina de intercambio aniónico. Mediante el establecimiento de estas condiciones, las proteínas con propiedades de superficie o carga solamente ligeramente diferentes se pueden separar de manera eficaz con un rendimiento elevado (por ejemplo, superior al 95%).

20 Las mejoras en la estructura de los soportes de resina de la cromatografía han hecho de la cromatografía a gran escala una alternativa práctica a los métodos de purificación más convencionales. Las resinas rígidas permiten procesar volúmenes grandes de manera rápida (menos de 5 horas) y una densidad de ligando elevada proporciona la capacidad incrementada necesaria para el procesamiento de volúmenes grandes.

25 En otra realización, la solución que comprende la proteína a concentrar es una solución tratada con disolvente/detergente que comprende la proteína. Por ejemplo, las IgG se pueden aislar de la Fracción de Cohn II y tratarse con un sistema de disolvente/detergente para la desactivación viral. Los sistemas de tratamiento con disolvente/detergente incluyen, por ejemplo, tri-n-butyl-fosfato/colato de sodio (TNBP/colato de sodio) y TWEEN/tri-n-butyl fosfato (TNBP).

30 En una realización, el disolvente/detergente es TNBP/colato de sodio. Por ejemplo, una solución de la Fracción de Cohn II+III o II se puede ajustar hasta una concentración final de tri-n-butyl fosfato (TNBP) al 0,3% y de colato de sodio al 0,2%. Después de la adición del disolvente (TNBP) y el detergente (colato de sodio), la solución de la Fracción de Cohn II+III o II se puede calentar hasta una temperatura óptima, por ejemplo 30°C, y mantenerse a esa temperatura durante un periodo de tiempo adecuado, tal como, por ejemplo, no inferior a aproximadamente 6 horas. Después de la etapa de tratamiento con disolvente/detergente, que implica la desactivación viral, los reactivos se pueden eliminar mediante precipitación y filtración, por ejemplo, a través de un conjunto de filtros graduados en porosidad hasta un filtro de 0,2 µm para formar una solución que comprende un producto del plasma (por ejemplo, IgG).

40 II. La primera membrana

45 Según la estrategia de filtración progresiva de dos fases de la presente invención, la solución que comprende la proteína se ultrafiltra utilizando la primera membrana para formar la primera fracción retenida que tiene la proteína a la primera concentración. En general, la retención de una molécula diana por una membrana de ultrafiltración se determina por un conjunto de factores que incluyen el peso molecular del producto del plasma a concentrar. Otros factores, tales como, por ejemplo, la forma molecular, la carga eléctrica y las condiciones operativas, pueden influir en la determinación del corte de peso molecular apropiado de la membrana. De manera preferente, la primera membrana tiene un corte de peso molecular suficiente para retener, como mínimo, una parte de la proteína presente en la solución que comprende la proteína, por ejemplo, como mínimo, del 10% a, como mínimo, aproximadamente el 90% o más de la proteína presente en la solución.

50 En algunas realizaciones, en las que la proteína a concentrar es IgG que tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kilodaltons (kDa), la solución que comprende la IgG se ultrafiltra utilizando una primera membrana que tiene un corte de peso molecular no superior a aproximadamente 100 kDa, de manera ilustrativa, no superior a aproximadamente 100, aproximadamente 75, y aproximadamente 50 kDa para formar una primera solución de fracción retenida que comprende el producto del plasma. En una realización, la primera membrana tiene un corte de peso molecular no superior a aproximadamente 50 kDa.

60 Después de la ultrafiltración utilizando la primera membrana, de manera preferente, la primera concentración de la proteína en la primera solución de fracción retenida es aproximadamente el 5% en proteína (p/v). De este modo, si la concentración de la proteína en la solución es inferior a aproximadamente el 5% en proteína (p/v), la ultrafiltración de la solución utilizando la primera membrana es suficiente para formar la primera solución de fracción retenida que

comprende aproximadamente el 5% en proteína (p/v).

La primera membrana puede ser cualquier membrana de ultrafiltración adecuada que se pueda seleccionar en base a sus características de rechazo para la proteína a concentrar según la presente invención. En algunas realizaciones, la primera membrana está fabricada de polietersulfona (PES) o celulosa regenerada. Entre los ejemplos no limitantes de la primera membrana se incluyen la membrana de ultrafiltración BIOMAX™ y Ultracel de módulo Pellicon, las membranas de ultrafiltración PT y PL de módulo Prostat, la membrana de ultrafiltración PT, PL, y Helicon del módulo de ultrafiltración de enrollado en espiral, fabricadas por Millipore Co., las membranas de ultrafiltración Sartocan™ y Ultrasart™, fabricadas por Sartorius AG, las membranas de ultrafiltración NOVA™, OMEGA™, ALPHA™, REGEN™, SUPOR™, fabricadas por Pall Co., la membrana de ultrafiltración Filmtec™, fabricada por Dow Chemical Co., y la membrana de ultrafiltración Kvick™, fabricada por Amersham Pharmacia Biotech Inc. En una realización, la primera membrana es una membrana PES que tiene un corte de peso molecular de 50 kDa, en la que la proteína es IgG.

En general, se lleva a cabo un proceso de ultrafiltración de tipo semicontinuo o de tipo continuo según la estructura de la membrana de filtración y el dispositivo de filtración. Además, se puede administrar de manera continua agua purificada a la fracción retenida para mantener un volumen constante. En una realización, la solución se ultrafiltra utilizando la primera membrana que utiliza un tipo de ultrafiltración de flujo cruzado continuo. En otra realización, el proceso de ultrafiltración se lleva a cabo de aproximadamente 2°C a aproximadamente 15°C.

En una realización, la ultrafiltración utilizando la primera membrana se basa en la tecnología de flujo tangencial, que es conocida en la técnica. El flujo tangencial produce una acción de "barrido" utilizando la superficie de la membrana, evitando así la acumulación de las macromoléculas retenidas en la fase de fracción retenida en la superficie de la membrana, minimizando de este modo la polarización de la concentración y las incrustaciones de la membrana. En algunas realizaciones, la solución que comprende la proteína se recircula a través de la parte superior de la membrana, es decir "de manera tangencial" a la superficie de la membrana.

III. Diafiltración

Después de la ultrafiltración utilizando la primera membrana, la primera solución de fracción retenida que comprende la proteína a la primera concentración (por ejemplo, aproximadamente el 5% en proteína (p/v)), se diafiltra con una solución acuosa utilizando la primera membrana para formar una segunda solución de fracción retenida que comprende la proteína a, sustancialmente, la primera concentración a efectos de eliminar cualquiera traza de los tampones de la cromatografía. La solución acuosa puede ser agua (por ejemplo, agua fría para inyección (CWFI)) o un tampón adecuado.

La diafiltración de la primera fracción retenida puede ser un proceso continuo o discontinuo. En el método de diafiltración continua, que también se refiere como diafiltración de volumen constante, la concentración de la proteína en la fracción retenida no cambia de forma sustancial durante el proceso de diafiltración. De este modo, el volumen de fracción retenida y la concentración de proteína no cambian de manera significativa, si lo hacen, durante la etapa de diafiltración.

En una realización, la diafiltración de la primera solución de fracción retenida utilizando la primera membrana comprende la utilización de un proceso continuo o discontinuo de diafiltración mediante el lavado a través, como mínimo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7 volúmenes de fracción retenida (es decir, como mínimo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7 "volúmenes de diafiltración (DV)") con, por ejemplo, CWFI.

De manera opcional, después de la etapa de diafiltración de la primera solución de fracción retenida, la primera membrana se puede enjuagar para recuperar cualquier proteína residual que permanece en la parte de la fracción retenida de la primera membrana. La proteína residual, si la hay, se puede combinar a continuación con la segunda fracción retenida antes de la ultrafiltración de la segunda fracción retenida utilizando la segunda membrana.

En una realización, la diafiltración utilizando la primera membrana se basa en la tecnología de flujo tangencial tal como se describe anteriormente.

IV. Ajuste con glicina y/o pH

La adición de glicina a la solución diafiltrada que comprende la proteína puede proporcionar un efecto beneficioso en el tamponado y control del pH de la solución que se procesa, aunque la propia proteína puede ejercer capacidad tamponadora. Otra ventaja de la introducción de glicina en esta fase es la reducción o la eliminación de la creación de especies agregadas por el efecto de cualquier ajuste del pH.

Antes de ultrafiltrar la segunda solución de fracción retenida que comprende la proteína diafiltrada, la segunda

retención se formula con glicina y se ajusta el pH. De manera preferente, el pH de la segunda retención se ajusta para que esté por debajo de un pH objetivo final (por ejemplo, aproximadamente 0,25 unidades por debajo del pH objetivo). En una realización, el pH de la segunda retención se ajusta a un pH aproximadamente de 4,2 a aproximadamente 4,3.

5 En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica es una formulación acuosa o líquida que comprende un tampón acetato aproximadamente de pH 4,0-5,5, un poliol (polialcohol), y de manera opcional, un surfactante, en la que la composición no comprende una sal, por ejemplo, cloruro sódico y en la que la composición es isotónica para el paciente.

10 **V. La segunda membrana**

De manera preferente, la etapa de ultrafiltración de la segunda fracción retenida, que se ha formulado con glicina y se ha ajustado el pH después de la diafiltración, se lleva a cabo utilizando una unidad de ultrafiltración que comprende, en general, cartuchos de fibras huecas de la segunda membrana, en la que la segunda membrana tiene un corte de peso molecular de aproximadamente dos veces el corte de peso molecular de la primera membrana. En una realización, en la que la proteína es IgG, el corte de peso molecular de la segunda membrana es aproximadamente 100 kDa, en la que la primera membrana tiene un corte de peso molecular de 50 kDa. En otra realización, en la que la proteína es IgG, la solución final de fracción retenida comprende la IgG a la segunda concentración, en la que la segunda concentración es, como mínimo, aproximadamente dos veces, tres veces, cuatro veces, o más de la primera concentración. En una realización, en la que la proteína es IgG, la solución final de fracción retenida comprende, como mínimo, aproximadamente el 19% de IgG (p/v).

De manera opcional, la segunda membrana se enjuaga y también se recupera cualquier proteína residual retenida por la segunda membrana.

La solución final de fracción retenida que comprende la proteína concentrada se puede procesar posteriormente en una formulación líquida estable. Por ejemplo, cuando la solución final de fracción retenida comprende IgG concentrada, según la presente invención, la solución se puede procesar posteriormente en una formulación líquida estable, por ejemplo, tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 4.396.608 de Tenold y otros, o en otra formulación final apropiada (por ejemplo, una formulación liofilizada). A modo de otro ejemplo para una formulación líquida que comprende IgG, el volumen final de la fracción retenida que comprende la IgG concentrada se puede ajustar para producir, como mínimo, aproximadamente el 16% de IgG (p/v), y, de manera opcional, el volumen estéril se puede mantener durante un periodo de tiempo, por ejemplo, no inferior a 21 días, suficiente para reducir la actividad anticomplemento y/o para desactivar lo virus con cubierta.

En una realización, la ultrafiltración utilizando la segunda membrana se basa en la tecnología de flujo tangencial descrita anteriormente.

40 La presente invención se ilustrará con más detalle mediante ejemplos.

EJEMPLOS

45 Ejemplo 1

Purificación de IgG a partir de la pasta de la fracción de Cohn II+III

50 La pasta de la Fracción II+III se solubiliza en 12 volúmenes de agua purificada a 5°C. El pH de la mezcla se ajusta hasta pH 4,2 con ácido acético y se mezcla durante 1 hora. Esta etapa coloca la IgG en solución.

A continuación, el pH de la mezcla se ajusta hasta pH 5,2 con NaOH y caprilato de sodio (la "variación del pH"). Las proteínas y los lípidos se precipitan. La mezcla se depura mediante filtración para eliminar el precipitado que interferiría con la desactivación del virus. La concentración de caprilato se ajusta a 20 mM a pH 5,1 y la mezcla se incubaba durante 1 hora a 25°C para realizar la desactivación del virus con cubierta.

55 La mezcla se filtra para producir una solución clara para cromatografía. La conductividad de la solución clara se ajusta entre 2,0 y 3,0 mS/cm utilizando agua purificada. El pH de la solución clara se ajusta entre 5,0 y 5,2 después del ajuste de la conductividad.

Ejemplo 2

Cromatografía

- 5 La solución clara anterior se aplica directamente a dos columnas de intercambio aniónico (un intercambio de aniones fuertes seguido de un intercambiador de aniones débiles) unidas en serie. La IgG fluye a través de la columna, mientras las impurezas (incluyendo el caprilato) se unen a las dos columnas aniónicas. Se obtienen purificaciones satisfactorias con las combinaciones de las resinas Q y ANX de Pharmacia Biotech y Fractogel RMAE de E. Merck.
- 10 La solución clara que comprende la IgG a purificar se aplica directamente al primer intercambiador aniónico que se equilibra con acetato de sodio 20 mM a pH 5,1. A continuación, se aplica la fracción que no se une (paso de flujo) de la primera columna de intercambio aniónico directamente en una segunda de columna de intercambio aniónico. Esta columna también se equilibra con tampón acetato 20 mM a pH 5,1. La solución de proteína se carga habitualmente en la primera columna a una proporción de 50-110 mg IgG/ml de resina empaquetada. La solución de proteína se
- 15 carga habitualmente en la segunda columna en una proporción de 75-95 mg IgG/ml de resina empaquetada. Las proporciones de proteína con respecto a resina también se ajustan más allá de estos límites, pero al hacerlo se puede afectar al rendimiento y la pureza. A la solución de proteína le sigue aproximadamente 2 volúmenes de columna del tampón de equilibrio, el cual arrastra por lavado de la columna cualquier IgG no unida. La fracción no unida que comprende la IgG altamente purificada se recoge como la solución que comprende el producto del plasma
- 20 (es decir, IgG) a concentrar.

Ejemplo 3

Ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) en dos fases

- 25 La solución que comprende la IgG (es decir, la solución después de la columna de cromatografía) se concentra hasta un material en volumen con aproximadamente el 5% de IgG (p/v) utilizando una membrana de polietersulfona de tipo C-screen que tiene un corte de peso molecular de 50 kDa. La temperatura de la solución concentrada se mantiene entre 2°C y 12°C. Después de la diafiltración de la solución al 5% con CWF1, el sistema se enjuaga y se
- 30 añade el material recubierto al material en volumen. A continuación, la solución concentrada se formula en glicina 0,25 M mediante la adición de glicina pura en polvo y el pH se ajusta según sea necesario. El rendimiento de la membrana del filtro no queda afectado (por obstrucciones o contaminación), ya que la proteína sólo está concentrada hasta el 5% (p/v).
- 35 Después de la etapa de formulación, la solución al 5% en glicina 0,25 M se transfiere a continuación a una segunda unidad de ultrafiltración para la concentración posterior utilizando una membrana de fibras huecas que tiene un corte de peso molecular de 100 kDa. El material se concentra, como mínimo, hasta aproximadamente el 19% de IgG (p/v). Antes de la formulación final (por ejemplo, el ajuste de la formulación líquida hasta igual o superior al 16% de IgG
- 40 (p/v) con la adición de los enjuagues y el ajuste del pH, si es necesario), la solución de IgG se filtra de manera estéril.

Ejemplo 4

UF/DF de paso en dos fases a mayor escala del paso de flujo de una columna Q/ANX a escala

- 45 Se concentró el paso de flujo recogido de la columna Q/ANX hasta una concentración de IgG de aproximadamente el 5%. El material se diafiltró con menos de 7 volúmenes de agua para inyección.
- 50 El diafiltrado al 5% se transfirió a un recipiente de formulación para el ajuste del pH y la adición de glicina. El objetivo establecido para el ajuste del pH fue de 4,15 a 4,25. El ajuste del material en este pH objetivo permitió que se consiguiera de manera uniforme un pH 4,50 (intervalo de 4,0 a 5,0) para el material en volumen estéril. Las soluciones para el ajuste del pH incluían HCl 0,5 M y NaOH 0,5 M.
- 55 Durante el proceso de formulación, se añadió glicina pura al material después de la diafiltración para llevar la concentración de la solución hasta aproximadamente 0,25M de glicina. La concentración de glicina 0,25 M en la fase anterior a la ultrafiltración final (UF) permitió conseguir un intervalo isotónico objetivo de 240-400 mOsm/Kg para el material en volumen estéril. Los parámetros de pH y glicina establecidos en la fase anterior a la UF final evitaron la necesidad de volver a ajustar el pH o de añadir glicina adicional en puntos posteriores en la cascada del proceso.
- 60 Una vez se completó el proceso de formulación, el material se filtró a través de un filtro Millipore KWSS, un filtro Milligard de 0,5 + 0,2 micras de disponible comercialmente para eliminar cualquier residuo antes de la concentración final con los cartuchos de fibras huecas de Koch (Koch Membrane Systems, Inc., Wilmington, MA). El material formulada con glicina se filtró a través del filtro KWSS y en el recipiente de alimentación de ultrafiltración (UF) para

los cartuchos de fibras huecas Koch. Después de completar la filtración, se utilizó un tampón de enjuague de glicina para enjuagar el recipiente de formulación, los conductos, y el filtro a efectos de recuperar el material de proteína residual. El tampón de glicina utilizado a lo largo del proceso fue glicina 0,25 M ajustado a un pH objetivo de 4,0 a 5,0.

5 La etapa de concentración final de UF se completó con la utilización de cartuchos de fibras huecas de Koch (Modelo # CTG.1"HF1.0-43-PM100-PB). La escala utilizada para el trabajo de desarrollo/escalado fue de 0,1 m² de área de membrana. El material formulado se concentró hasta aproximadamente el 20%. El intervalo de presión de alimentación establecido para el proceso fue de 25 a 27 psig (objetivo: 26 psig). El intervalo de presión de la fracción retenida fue de 10 a 12 psig (objetivo: 11 psig). El intervalo de temperaturas fue de 2°C a 20°C.

10 Se utilizó un baño de glicol para controlar la temperatura. Durante el final de la fase de concentración final, en la que el material de la fracción retenida se volvió más viscoso, las temperaturas del proceso alcanzaron temperaturas de 18°C, pero nunca superaron los 20°C. No se observaron condiciones adversas mientras se operaba en el final superior del intervalo de 2°C a 20°C.

15 Después el material se concentró hasta aproximadamente el 20%, el sistema se drenó y, a continuación, se enjuagó con tampón de glicina 0,25 M a efectos de recuperar la proteína residual. El método de enjuagado utilizado era un enjuagado de un único pase con una cantidad específica de tampón de glicina 0,25 M. La cantidad de enjuagado puede ser dependiente de la escala del proceso y se puede limitar a un volumen que no sobrediluirá el material en el proceso. La concentración deseada para el concentrado de UF diluido fue del 18%. Esta concentración diana permitió la utilización de tampón de enjuague adicional en las fases de Volumen Estéril Inicial ("Initial Sterile Bulk") (ISB) y Volumen Estéril Final ("Final Sterile Bulk") del proceso. Se realizaron dos enjuagues separados en el sistema después de la concentración. La mayor cantidad de proteína residual se recuperó durante el primer enjuague. Los enjuagues 1 y 2 se volvieron a añadir al material concentrado de la UF a efectos de llevar la concentración a aproximadamente el 17,5%.

20 A continuación, el concentrado diluido de la UF se mezcló y se filtró de forma estéril utilizando un filtro de capacidad elevada estéril (SHC) Express Millipore. Entre las opciones para la filtración estéril preclínica, clínica y de producción comercial se incluyen la utilización de una versión autoclavable o con radiación gamma del filtro SHC. También el ISB se puede combinar y filtrar de forma estéril en un volumen estéril final más amplio. La combinación de volúmenes para liberar la instalación de llenado estéril (SFF) disminuirá la pérdida de rendimiento para las operaciones de llenado.

25 Tras completar las operaciones de llenado, el material se puede poner en incubación de 23°C a 27°C (objetivo: 24°C) durante un mínimo de 21 días y no superar los 28 días. El procedimiento de incubación puede permanecer igual o se puede cambiar dependiendo, por ejemplo, los resultados de validación virales.

30 Ejemplo 5

35 Evaluación de los cassettes de filtración

40 La escala utilizada para el trabajo de desarrollo/escalado fue de 0,1 m² de área de membrana y el intervalo de temperatura operacional de UF/DF fue de 2°C a 20°C. Se utilizó el material en el proceso de un proceso de producción de IGIV. El material de partida incluía los materiales del paso de flujo de la columna Q/ANX, antes de la diafiltración al 5% y después de la diafiltración al 5%.

45 Los cassettes evaluados incluían cassettes de 50 kD y 100 kD de Millipore junto con diferentes opciones de malla. También se examinaron filtros de 70kD (Pall Inc., East Hills, NY). La presión transmembrana (TMP) óptima determinada para cassettes de 100 kD de Millipore fue de 15 psig (presión de alimentación de 25 psi y presión de la fracción retenida de 5 psi). La presión transmembrana (TMP) óptima determinada para cassettes de 50 kD de Millipore fue de 17,5 psig (presión de alimentación de 25 psi y presión de la fracción retenida de 10 psi). La presión transmembrana (TMP) óptima determinada para cassettes de 70 kD de Pall fue de 20 psig (presión de alimentación de 20 psi y presión de la fracción retenida de 10 psi).

50 Ejemplo 6

55 Purificación de IgG a partir de medio de cultivo celular

60 El medio de crecimiento de líneas celulares que contiene anticuerpos monoclonales secretados se ajusta primero hasta el pH y la conductividad más correctas. Esto se lleva a cabo mediante la diafiltración frente a agua purificada mientras se ajusta el pH hasta 4,2 con ácido acético. La conductividad de la solución se ajusta a menos de 1,0 mS. La purificación y la concentración del anticuerpo monoclonal se consigue mediante las etapas anteriores.

Ejemplo 7

Efecto de varios parámetros en la viscosidad, formación de agregados, fragmentación y formación de dímeros

En base a los datos generados, se encontró que el incremento de la cantidad de glicina en la formulación no afectaba en la concentración de proteína final conseguida. Se puede conseguir aproximadamente la misma solución de concentración superior de proteína mediante la formulación de la solución utilizando glicina en un intervalo entre 0,05 M y 0,3 M. Cuando la concentración de la solución de proteína se realiza en presencia de agua en lugar de glicina, la solución final de proteína es aproximadamente 3-4% p/v unidades menos concentrada.

Además, no hubo cambio en la viscosidad de una solución de proteína IgG cuando se formuló con glicina en el intervalo de 0,05 M a 0,5 M. Por ejemplo, las viscosidades de varias formulaciones de soluciones de IgG, con una concentración del 16% p/v y pH 4,2, entre 0,2 M y 0,5 M de glicina, permanecieron aproximadamente a 7,9 centipoise (cP) (véase, por ejemplo, la figura 2).

Además, otros han propuesto que la adición de NaCl a un tampón de formulación puede disminuir de manera apreciable la viscosidad de una solución. En el ejemplo presentado en este documento, con anticuerpos (IgG) derivados del plasma, la adición de NaCl en el tampón de formulación, en cantidades cualesquiera entre 0,05 M y 0,3 M, incrementó la viscosidad de la solución de proteína hasta 2,6 cP (desde 7,9 cP, sin NaCl, hasta 10,5 cP con NaCl 0,3 M, en una solución de IgG al 16% p/v en glicina 0,2 M, pH 4,2) (figura 2).

Tal como se muestra en la figura 3, la viscosidad de una solución de proteína se puede expresar como una función polinomial de tercer orden, dependiente de la concentración de proteína. Para determinar la dependencia de la viscosidad con la temperatura, se analizaron dos concentraciones de proteína que tenía el mismo pH y la misma composición de tampón. Tal como se muestra en la figura 4, la dependencia de la viscosidad con la temperatura está afectada por la concentración de proteína (por ejemplo, existe una dependencia más pronunciada de la viscosidad para la muestra a una mayor concentración para el producto diluido).

Además, la presencia de glicina permitía alcanzar concentraciones más elevadas de proteína. La concentración en el punto final conseguida en presencia de agua o glicina se muestra en la figura 5 (DF = diafiltrada), en la que se observa que la presencia de glicina permite alcanzar una concentración final de proteína mucho más elevada. El pH de la solución se mantuvo igual para ambos procesos (alrededor de 4,2), mientras que las mediciones de viscosidad se realizaron siempre a 20°C. La concentración en el punto final se alcanzó cuando se detuvo el flujo de la fracción retenida en el sistema de UF/DF.

Además, la dependencia de la viscosidad en función del pH de la solución de proteína se muestra en la figura 6 para una serie de soluciones que contienen concentraciones iguales de proteína (17% p/v). Con el tiempo, la viscosidad para la muestra no cambió, manteniéndose casi en el mismo valor, a excepción de las variaciones normales esperadas por la manipulación de soluciones de concentración de proteína elevada bajo condiciones de medición experimentales. Por otro lado, se cree que la formación de agregados es, como mínimo, dependiente de la concentración de proteína, bajo unas condiciones similares de temperatura, pH y composición de tampón. Por consiguiente, la figura 7 muestra los resultados de experimentos realizados a varias concentraciones de proteína y están dirigidos a valorar el grado de formación de agregados bajo condiciones controladas. Además, la figura 8 muestra la dependencia de la formación de agregados con el pH de la formulación para varias muestras que contienen la misma concentración de proteína (17% p/v) y composición de tampón (Gly 0,2 M) durante el periodo de un año. Estos resultados sugerían, como mínimo, que la formación de agregados se puede reprimir mediante el pH de la formulación. Formulaciones de pH más elevado pueden ser más favorables para la formación de agregados.

Además, en la figura 9 se muestra el nivel de dímeros presentes correlacionado con el incremento en el pH de las formulaciones. Para una serie de muestras bajo condiciones similares de concentración de proteína, composición de tampón y temperatura, la población de dímeros presente en una muestra puede ser aproximadamente el triple mediante la modificación del pH de la formulación en 1 unidad. Además, el nivel de dimerización cambió con el tiempo de una manera predecible, en función del pH y el tiempo transcurrido durante el almacenamiento.

Finalmente, mediante el control del pH de la solución de proteína, se pueden manipular los niveles de fragmentación de la molécula de IgG. La figura 10 muestra la respuesta con el transcurso del tiempo (hasta un año) de la fragmentación de moléculas de IgG en una solución del 17% (p/v) almacenada a 25°C en función del pH., Además de retardar la aparición de fragmentos, un incremento del pH también disminuía la velocidad de formación de fragmentos.

REIVINDICACIONES

1. Método para concentrar una proteína de una solución que comprende la proteína, comprendiendo el método:
 - 5 a) ultrafiltrar la solución utilizando una primera membrana para formar una primera solución de fracción retenida que comprende la proteína en una primera concentración, en la que la primera membrana tiene un corte de peso molecular suficiente para retener, como mínimo, una parte de la proteína presente en la solución;
 - b) diafiltrar la primera solución de fracción retenida con una solución acuosa utilizando la primera membrana para formar una segunda solución de fracción retenida que comprende la proteína a aproximadamente la
10 primera concentración;
 - c) formular la segunda fracción retenida que comprende la proteína diafiltrada con glicina y ajustar el pH; y
 - d) ultrafiltrar la segunda solución de fracción retenida utilizando una segunda membrana para formar una solución final de fracción retenida que comprende la proteína a una segunda concentración, en el que la
15 segunda membrana tiene un corte de peso molecular de aproximadamente dos veces el corte de peso molecular de la primera membrana, en el que la segunda concentración es superior a la primera concentración.
2. Método, según la reivindicación 1, en el que la proteína es un producto del plasma.
3. Método, según la reivindicación 1, en el que la primera membrana es una membrana de polietersulfona de tipo
20 C-screen que tiene un corte de peso molecular de 50 kDa.
4. Método, según la reivindicación 1, en el que la primera concentración es aproximadamente el 5% en proteína (p/v).
5. Método, según la reivindicación 1, en el que la solución acuosa es agua.
25
6. Método, según la reivindicación 1, en el que el excipiente es glicina.
7. Método, según la reivindicación 1, en el que la segunda membrana es una membrana de fibras huecas.
30
8. Método, según la reivindicación 1, en el que la segunda membrana tiene un corte de peso molecular de 100 kDa.
9. Método, según la reivindicación 1, en el que la segunda concentración es, como mínimo, aproximadamente el
35 19% en proteína (p/v).
10. Método, según la reivindicación 1, en el que la primera membrana tiene un corte de peso molecular suficiente para retener, como mínimo, el 90% de la proteína presente en la solución.
11. Método, según la reivindicación 4, en el que la primera concentración es aproximadamente el 5%, en el que, en
40 la etapa c), aproximadamente el 5 % de la proteína diafiltrada se formula en aproximadamente 0,16 a aproximadamente 0,30 M de glicina y el pH se ajusta a aproximadamente 4.3.
12. Método para concentrar una proteína de una solución que comprende la proteína, según la reivindicación 1,
45 comprendiendo el método:
 - a) ultrafiltrar la solución utilizando una primera membrana para formar una primera solución de fracción retenida que comprende la proteína a una primera concentración de aproximadamente el 5%, en el que la primera
50 membrana tiene un corte de peso molecular suficiente para retener, como mínimo, aproximadamente el 90% de la proteína;
 - b) diafiltrar la primera solución de fracción retenida utilizando la primera membrana con agua para formar una segunda solución de fracción retenida que comprende la proteína a aproximadamente la primera
concentración;
 - c) formular aproximadamente el 5 % de la proteína diafiltrada de la etapa b) en aproximadamente 0,16 a
55 aproximadamente 0,30 M de glicina, en el que la formulación comprende además ajustar el pH hasta aproximadamente 4,3; y
 - d) ultrafiltrar la segunda solución de fracción retenida utilizando una segunda membrana para formar una solución final de fracción retenida que comprende la proteína a una segunda concentración de
60 aproximadamente el 19 a aproximadamente el 21 %, en el que la segunda membrana tiene un corte de peso molecular de aproximadamente dos veces el corte de peso molecular de la primera membrana, en el que la segunda concentración es superior a la primera concentración.
13. Método, según la reivindicación 1 ó 12, en el que la proteína es IgG.

14. Método, según la reivindicación 13, en el que la primera membrana tiene un corte de peso molecular de aproximadamente 25 kDa a aproximadamente 75 kDa.

5 15. Método, según la reivindicación 14, en el que la primera membrana tiene un corte de peso molecular de aproximadamente 50 kDa, en el que la segunda membrana tiene un corte de peso molecular de aproximadamente 100 kDa.

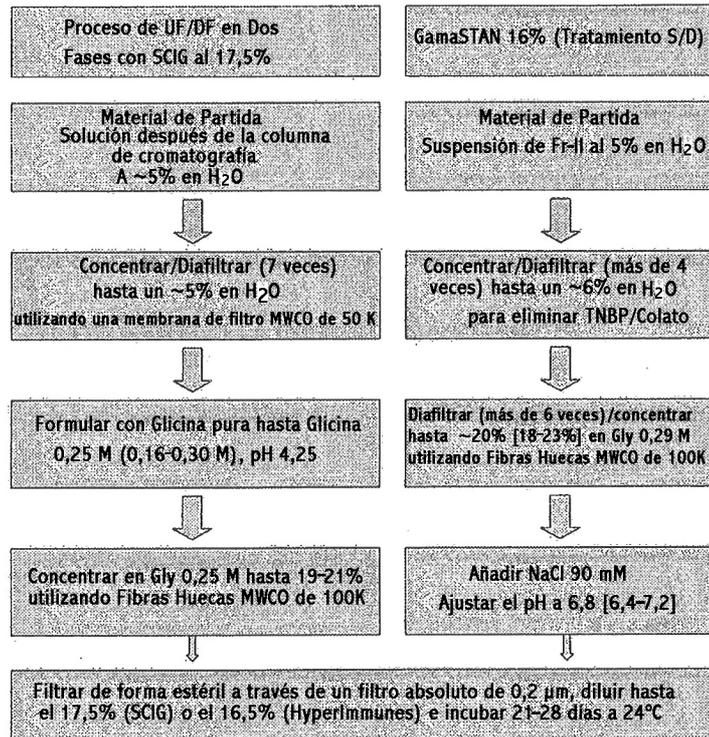


FIG. 1

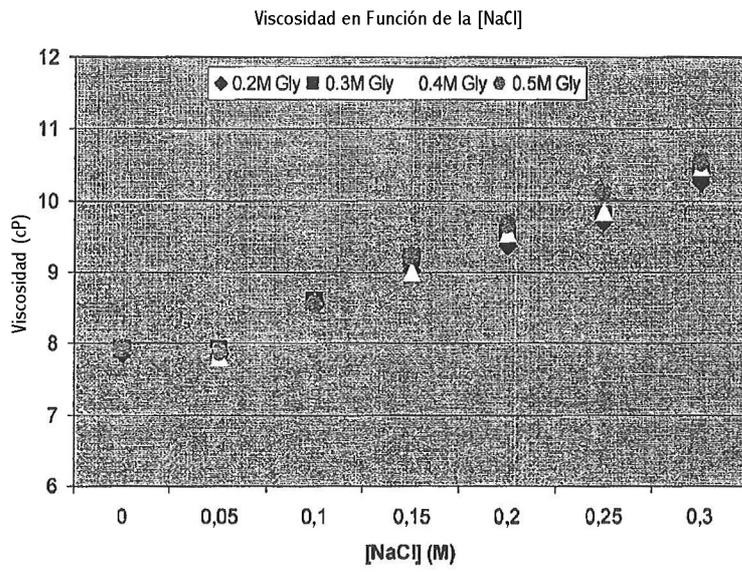


FIG 2

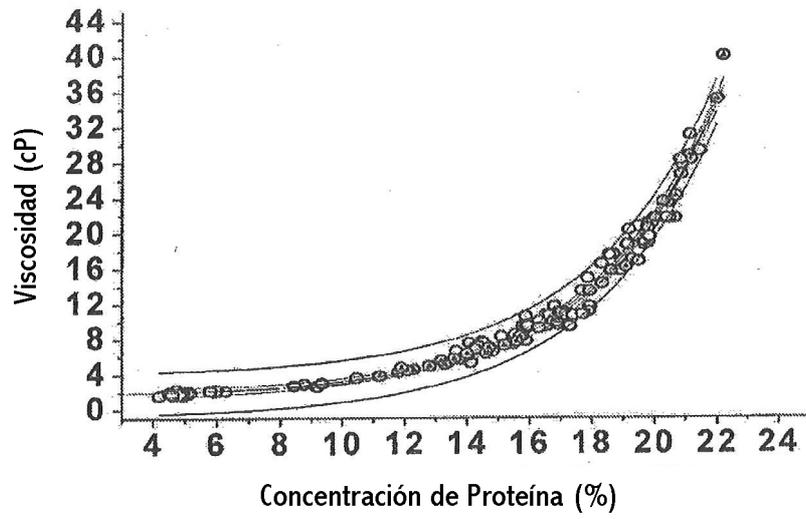


FIG. 3

Dependencia de la Viscosidad con la Temperatura

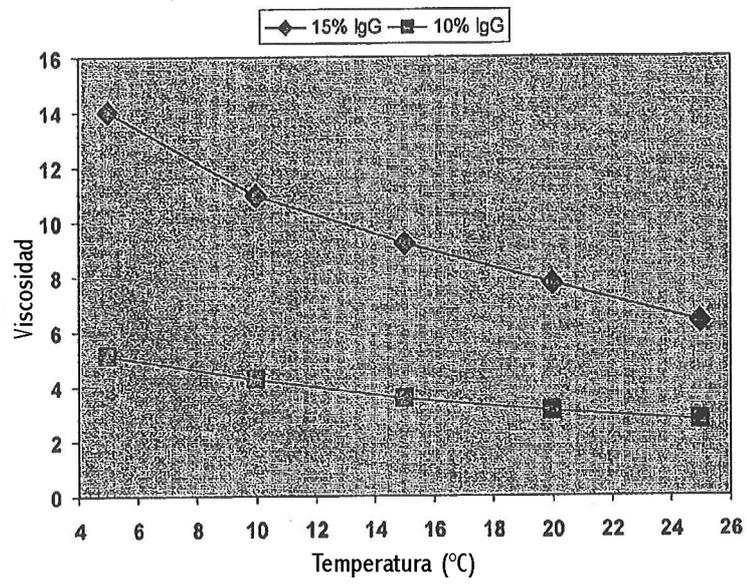


FIG 4

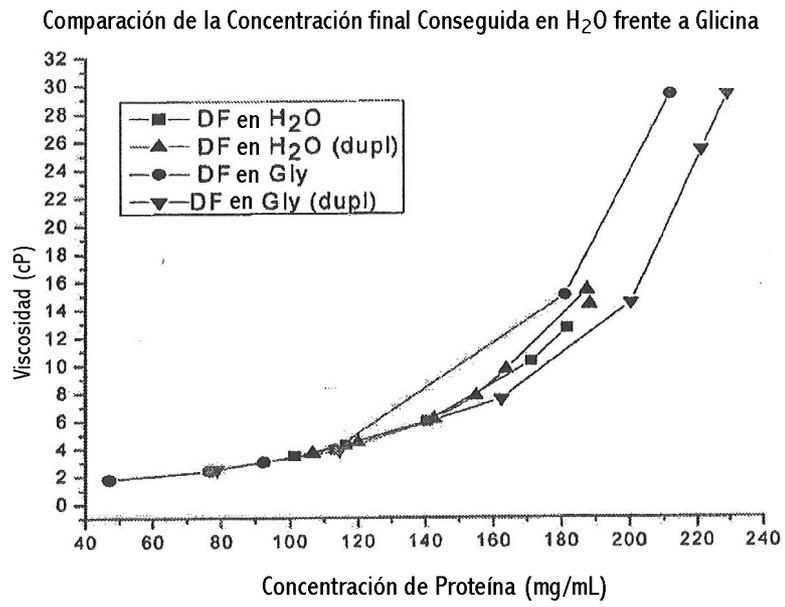


FIG. 5

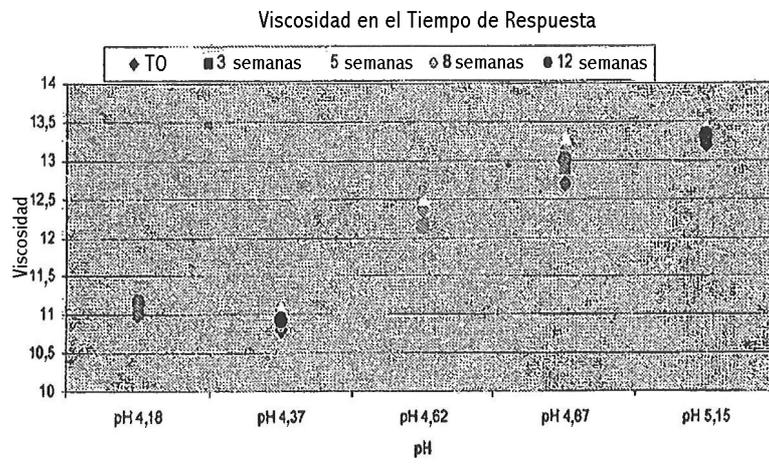


FIG. 6

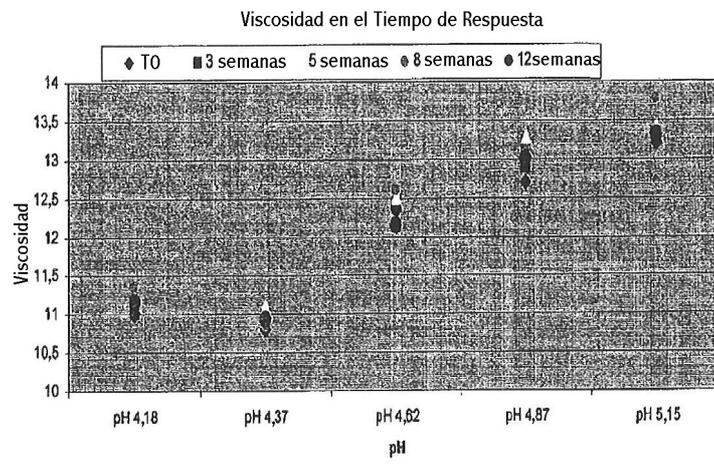


FIG 6

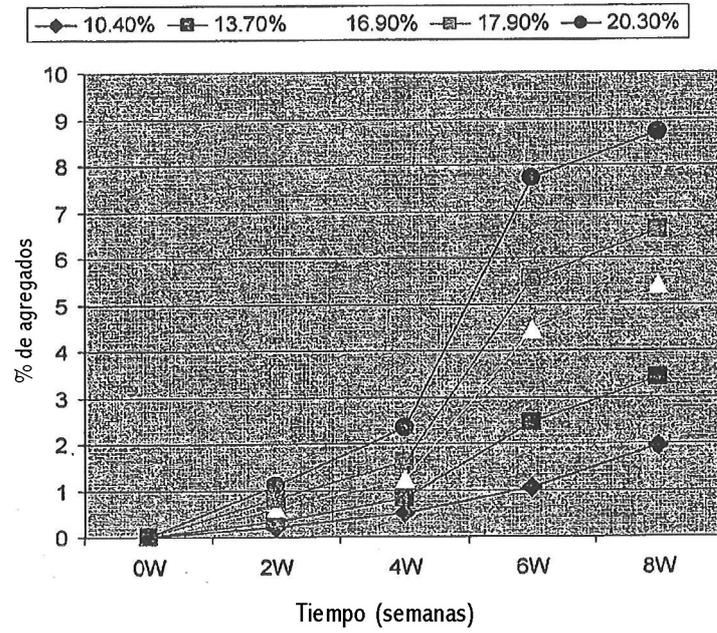


FIG 7

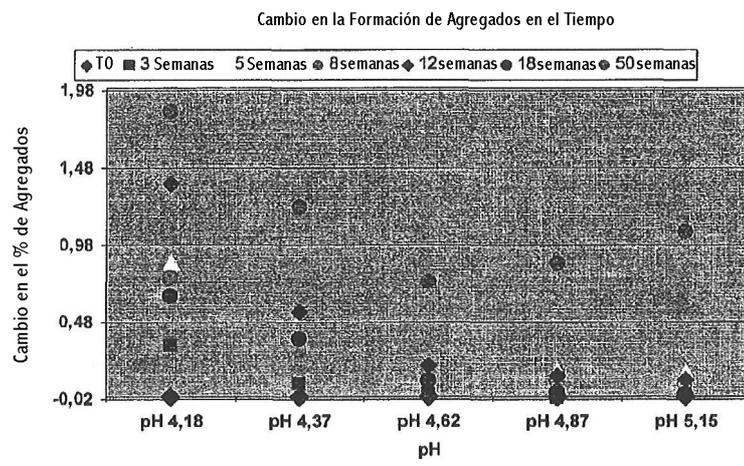


FIG 8

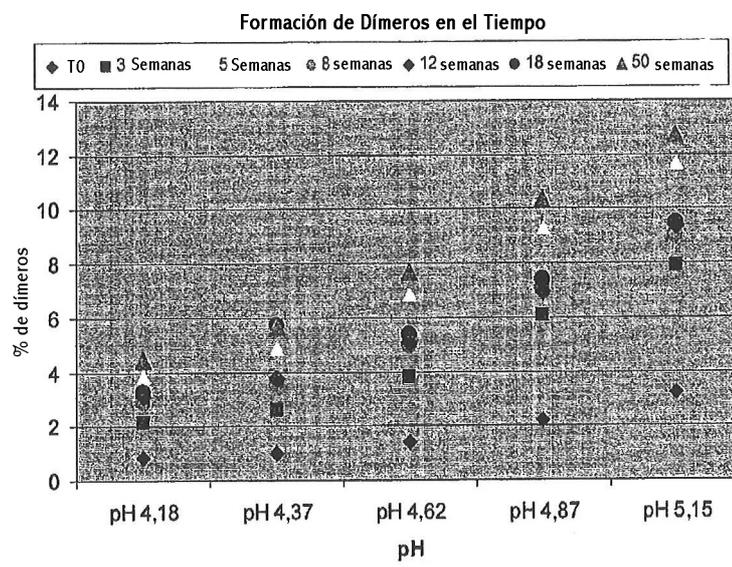


FIG 9

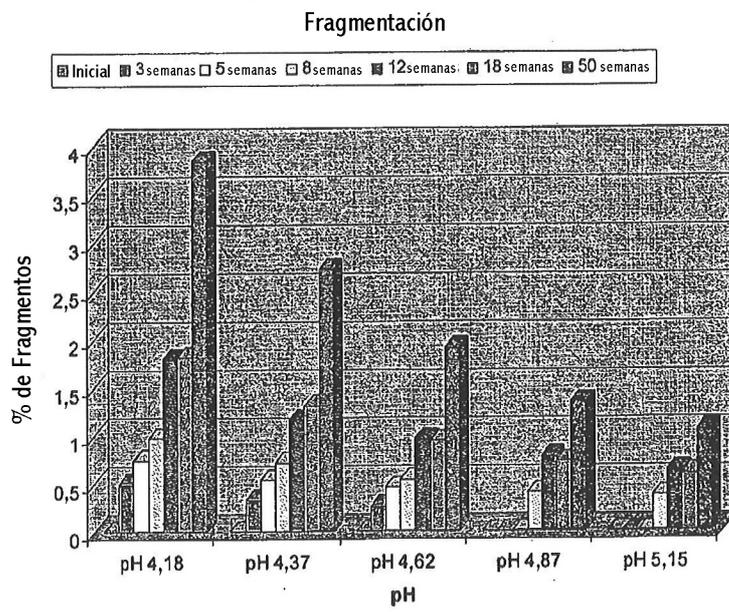


FIG 10.