

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 541**

51 Int. Cl.:

C07K 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2005 E 05806393 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 1786830**

54 Título: **Proceso para la concentración de anticuerpos y productos terapéuticos de los mismos**

30 Prioridad:

09.09.2004 US 609092 P
06.09.2005 US 220362

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

10.02.2015

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (50.0%)
1 DNA Way
South San Francisco CA 94080-4990, US y
NOVARTIS AG (50.0%)

72 Inventor/es:

WINTER, CHARLES MATTHEW

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 528 541 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

Proceso para la concentración de anticuerpos y productos terapéuticos de los mismos

5 **Antecedentes**

Se conocen métodos para aislar, purificar y concentrar materiales biológicos e incluyen, por ejemplo cromatografía, ultrafiltración y liofilización, véase, en general, R. Hatti-Kaul *et al.*, "Downstream Processing in Biotechnology," en Basis Biotechnology, Capítulo 9, páginas 187-211, 2ª ed., Cambridge University Press (2001). Se conocen procesos para hacer preparaciones de anticuerpos monoclonales concentradas para la administración a seres humanos, véase por ejemplo la Patente de EE.UU. N° 6.252.055, que usa ultrafiltración y que recircula el filtrado resultante.

Algunos de los retos asociados con los métodos de concentración de anticuerpos disponibles incluyen, por ejemplo, flujos bajos, tiempos de proceso largos, áreas de membrana grandes, rendimiento de recuperación mecánica y pérdidas, intervención o manipulación intensiva del operador, velocidades de transferencia de masa bajas, ineficiencias energéticas, y límites de presión hidráulica en el equipamiento de concentración. Estos y otros retos pueden contribuir a un coste total de fabricación alto y finalmente a costes mayores para los consumidores del fármaco terapéutico.

Existe una necesidad de procesos mejorados para preparar formulaciones de proteínas altamente concentradas, tales como las preparaciones líquidas de anticuerpos y productos terapéuticos de las mismas.

Sumario

En términos generales, la presente divulgación generalmente se refiere a procesos para concentrar proteínas, tales como procesos para concentrar una preparación de anticuerpos, formulaciones farmacéuticas que contienen dicha preparación, y a su uso en terapia en seres humanos o terapia en animales.

En realizaciones, la presente divulgación proporciona procesos para preparar proteínas altamente concentradas, tales como preparaciones de anticuerpos de acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones; y productos terapéuticos preparados por el proceso, tales como productos terapéuticos de anticuerpos. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un proceso para concentrar proteínas que comprende, de acuerdo con la invención: una primera ultrafiltración de una primera preparación de anticuerpos para proporcionar una segunda preparación de anticuerpos; una diafiltración de la segunda preparación de anticuerpos para proporcionar una preparación diafiltrada de anticuerpos intermedia; y una segunda ultrafiltración de la preparación diafiltrada de anticuerpos intermedia para proporcionar una tercera preparación de anticuerpos, en la que una o más de la primera diafiltración, la segunda ultrafiltración, y la diafiltración se llevan a cabo a temperaturas elevadas, por ejemplo, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C, y como se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación también proporciona, en realizaciones de la invención, un proceso para concentrar proteínas que comprende: una primera ultrafiltración de una primera mezcla de proteínas para proporcionar una segunda mezcla de proteínas; una diafiltración de la segunda mezcla de proteínas para proporcionar una mezcla de proteínas diafiltrada; y una segunda ultrafiltración de la mezcla de proteínas diafiltrada para proporcionar una tercera mezcla de proteínas, en la que una o más de la primera ultrafiltración, diafiltración, y segunda ultrafiltración se llevan a cabo a, por ejemplo, aproximadamente 45 °C, como se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación también se refiere a una composición de anticuerpos altamente concentrada preparada por los procesos anteriores.

50 **Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 ilustra un aparato para llevar a cabo el proceso preparativo, en realizaciones de la presente divulgación.

Las FIG. de 2 a 17 ilustran diversos valores de proceso observados o medidos a lo largo de diversas fases o modos del proceso, en realizaciones de la presente divulgación.

Las FIG. 18 y 19 ilustran el efecto de la temperatura elevada en la calidad del producto, en realizaciones de la presente divulgación.

Las FIG. 20 y 21 ilustran el efecto de la temperatura elevada en el control de la carga biológica, en realizaciones de la presente divulgación.

La FIG. 22 ilustra el efecto de la temperatura elevada en el flujo del proceso y el tiempo de proceso, en realizaciones de la presente divulgación.

Las FIG. de 23 a 25 ilustran diversos valores del proceso observados o medidos a lo largo de diversas fases o modos del proceso a mayor escala, en realizaciones de la presente divulgación.

65

Descripción detallada

Las diversas realizaciones de la presente invención divulgadas en el presente documento se describirán en detalle con referencia a las figuras, si hubiera. La referencia a diversas realizaciones no limita el alcance de la invención, que está limitada solamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas a la misma. Adicionalmente, cualquiera de los ejemplos expuestos en esta memoria descriptiva no tiene por objeto la limitación y meramente expone algunas de las muchas realizaciones posibles de la invención reivindicada.

Se usan las siguientes, a menos que se describa lo contrario:

“Ultrafiltrar”, “ultrafiltración”, “ultrafiltrado”, “UF”, y términos similares se refieren a, por ejemplo, usar membranas sintéticas semipermeables, con propiedades físicas y químicas apropiadas, para discriminar entre las moléculas en la mezcla, principalmente basándose en el peso molecular y en la forma, y llevar a cabo la separación de distintas moléculas o llevar a cabo la concentración de moléculas similares.

“Diafiltrar”, “diafiltración”, “diafiltrado”, “diafiltrando”, “DF”, y términos similares se refieren a, por ejemplo, usar una membrana de ultrafiltración para eliminar, reemplazar, o disminuir la concentración de sales o disolventes de soluciones o mezclas que contienen proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, u otras biomoléculas.

“Presión transmembrana” o “PTM” se refiere al promedio de la presión aplicada desde la alimentación a la cara de filtrado de la membrana calculada como $PTM [kPa] = [(P_F + P_R)/2] - P_f$, donde P_F es la presión de alimentación, P_R es la presión del retenido y P_f es la presión del filtrado.

“Filtración de flujo tangencial”, “filtración de flujo cruzado”, “FFT”, y términos similares se refieren a un modo de filtración en el que la solución que contiene soluto pasa tangencialmente a través de una membrana UP y las sales o solutos de bajo peso molecular pasan a través de esta aplicando presión.

“Anticuerpo” se usa en el más amplio sentido y abarca específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, siempre que estos muestren la actividad biológica deseada. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmune que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. Descrito en términos de su estructura, un anticuerpo es una proteína con forma de Y que consiste en cuatro cadenas de aminoácidos, dos pesadas y dos ligeras. En un modelo simplificado lo suficiente para esta apelación, cada anticuerpo tiene principalmente dos regiones: una región variable y una región constante. La región variable, se localiza en los extremos de los brazos de la Y, se une a e interacciona con el antígeno diana. Esta región variable incluye una región determinante de la complementariedad (CDR) que reconoce y se une a un sitio de unión específico en un antígeno particular. La región constante, localizada en la cola de la Y, se reconoce por e interacciona con el sistema inmune (Janeway, C, Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana generalmente tiene numerosos sitios de unión, también denominados epítopos, reconocidos por las CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítipo distinto tiene una estructura distinta. Por lo tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente.

La unidad básica de anticuerpo de 4 cadenas es una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y de dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y por lo tanto contiene 10 sitios de unión antigénica, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes que comprenden de 2 a 5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también está espaciada regularmente por puentes de disulfuro intracatenarios. Cada cadena H tiene en el extremo N terminal un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N terminal un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. El emparejamiento de un dominio V_H junto con un dominio V_L forma un solo sitio de unión antigénica. Para la estructura y propiedades de las distintas clases de anticuerpos, véase por ejemplo, *Basic and Clinical Immunology*, 8ª edición, D. Stites, A. Terr y T. Parslow (eds.), Appleton y Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrados se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a distintas clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases basándose en diferencias relativamente menores en la secuencia y la función del C_H , por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término “variable” se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media la unión antigénica y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de la extensión de aproximadamente 110 aminoácidos de los dominios variables. En vez de eso, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones marco conservadas (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de extrema variabilidad denominadas “regiones hipervariables” que son cada una de 9 a 12 aminoácidos de longitud. Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprende cuatro FR, adoptando mayoritariamente una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen unidas en proximidad cercana por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión antigénica de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo “antibody dependent cellular cytotoxicity” (ADCC).

La expresión “región hipervariable” cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión antigénica. La región hipervariable generalmente comprende restos de aminoácidos de una “región determinante de la complementariedad” o “CDR” (por ejemplo, aproximadamente alrededor de los restos de Kabat 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del V_L , y aproximadamente alrededor de los restos de Kabat 31-35B (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del V_H (véase Kabat *et al.*, anteriormente mencionado) y/o los restos de un “bucle hipervariable” (por ejemplo, aproximadamente alrededor de los restos de Chothia 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del V_L , y 26-32 (H1), 52A-55 (H2) y 96-101 (H3) del V_H (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)).

La expresión “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo o a los mismos epítopos, excepto por posibles variantes que pueden originarse durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes presentes generalmente en cantidades menores. Dicho anticuerpo monoclonal normalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido que se une a una diana, en la que la secuencia de polipéptido de unión a la diana se obtuvo por un proceso que incluye la selección de una sola secuencia de polipéptido de unión a diana de una pluralidad de secuencias de polipéptido. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon de una pluralidad de clones, tal como un conjunto de clones de hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Debería entenderse que la secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de esta invención. Al contrario que las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra distintos determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que normalmente no están contaminadas con otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como aquel que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden estar hechos por diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563-681, (Elsevier, N. Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nº 4.816.567), tecnologías de presentación a fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 101 (34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a los humanos en animales que tienen parte o todos los *loci* o genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:2551 (1993); Jakobovits, *et al.*, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann, *et al.*, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); Patentes de EE.UU. Nº 5.545.806; 5.569.825; 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; documento WO 1997/17852; Patentes de EE.UU. Nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks, *et al.*, *BiolTechnology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg, *et al.*, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild, *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o

pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que la cadena o cadenas restantes son idénticas con respecto a u homólogas a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otras clases o subclases de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que estos muestren la actividad biológica deseada (Patente de EE.UU. N° 4.816.567; y Morrison, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81: 6851-6855 (1984)). Anticuerpo humanizado como se usa en el presente documento es un subconjunto de anticuerpos quiméricos.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor o aceptor) en las que los restos de la región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad, y capacidad deseada. En algunos casos, los restos de la región Fv marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo tal como la afinidad de unión. Generalmente, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de una inmunoglobulina humana aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos que mejoren la afinidad de unión. El número de estas sustituciones de aminoácidos en las FR es de normalmente no más de 6 en la cadena H, y no más de 3 en la cadena L. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de una inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones, *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann, *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión antigénica o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la Patente de EE.UU. N° 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata, *et al.*, Protein Eng., 8(10): 1051-1062 (1995)); moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión antigénica, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (VH), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión antigénica, es decir, tiene un solo sitio de unión antigénica. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo da lugar a un solo fragmento F(ab')₂ grande que aproximadamente corresponde a dos fragmentos Fab unidos por disulfuros que tienen actividad de unión antigénica divalente y aun es capaz de entrecruzar el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por que tienen unos pocos restos adicionales en el extremo carboxi terminal del dominio C_H1 que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para los Fab' en los que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxilo terminales de ambas cadenas H que se mantienen unidas mediante disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por las secuencias de la región Fc, cuya región es también la parte reconocida por los receptores Fc (FcR) que se encuentran en determinados tipos de células.

"Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento antigénico y de unión antigénica. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de la región variable de la cadena pesada y uno de la ligera en asociación estrecha, no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios emergen seis bucles hipervariables (3 bucles de cada una de las cadenas H y L) que contribuyen a los restos de aminoácidos para la unión antigénica y confieren especificidad de unión antigénica al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la habilidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con menor afinidad que el sitio de unión antigénica completo.

Los "Fv monocatenarios" también abreviados como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una sola cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv además comprende un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión antigénica. Para una revisión de los sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

5 “Aproximadamente” que modifica, por ejemplo, la cantidad de un ingrediente en las composiciones, concentración de un activo, volúmenes de tampón, diavolumenes, tamaño de poro, peso molecular aparente, corte de peso molecular, temperatura de proceso, tiempo de proceso, rendimientos, velocidades de flujo, presiones, cargas biológicas, y valores similares, e intervalos de los mismos, empleados en los métodos de la invención, se refiere a la variación de la cantidad numérica que puede ocurrir, por ejemplo, a lo largo de la medición típica y los procedimientos de manipulación usados para hacer concentrados o soluciones de uso; a través de errores inadvertidos en estos procedimientos; a través de diferencias en la fabricación, fuente, o pureza de los ingredientes empleados para hacer las composiciones o llevar a cabo los métodos; y consideraciones similares. El término “aproximadamente” también abarca cantidades que difieren debido al envejecimiento de una composición con una concentración o mezcla particular inicial. El término “aproximadamente” también abarca cantidades que difieren debido a la mezcla o procesado de una composición con una concentración o mezcla particular inicial. Se modifiquen o no por el término “aproximadamente” las reivindicaciones incluyen equivalentes a las cantidades.

15 “Que consiste esencialmente en” se refiere a un proceso de obtención de una composición de proteínas concentrada a una composición de anticuerpos que incluye las etapas e ingredientes enumerados en la reivindicación, además de otras etapas e ingredientes que no afectan materialmente a las propiedades básicas y novedosas de la composición, tales como una multiplicidad de etapas o medios tamponados. Los ingredientes que afectan materialmente a las propiedades básicas de la composición y método de la presente divulgación imparten características indeseables que incluyen, por ejemplo, carga biológica, tal como la toxicidad o irritabilidad indeseable asociada con contaminantes.

20 Se entiende que los artículos indefinidos “un”, “una”, “unos” o “unas” y sus correspondientes artículos definidos “el”, “la”, “los” o “las” como se usan en el presente documento, significan al menos uno, o uno o más, al menos que se especifique lo contrario.

25 La presente divulgación proporciona, en realizaciones, los procesos anteriormente mencionados de la invención como se definen en las reivindicaciones y los productos concentrados de los anticuerpos de los mismos.

30 En realizaciones de la presente divulgación, los procesos preparativos y los productos de los mismos pueden usarse para preparar preparaciones de anticuerpos altamente concentradas y preparaciones similares, tal como purificar y concentrar proteínas o sustancias similares de fuentes naturales o sintéticas, y cuyos productos pueden ser útiles para tratar afecciones patológicas, tales como asma, cáncer, psoriasis, inhibir angiogénesis, y afecciones patológicas similares.

35 En realizaciones del proceso anteriormente mencionado para preparar composiciones de anticuerpos altamente concentradas de la divulgación, lo siguiente ejemplifica adicionalmente cómo hacer y usar los procesos preparativos y los productos de la divulgación.

40 En realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un proceso para preparar composiciones de anticuerpos altamente concentradas, por ejemplo, de acuerdo con la realización de las siguientes etapas en el orden en el que se citan, que comprende:

45 una primera ultrafiltración de una primera preparación de anticuerpos, que tiene una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 gramos por litro (g/l), para proporcionar una segunda preparación de anticuerpos como el retenido, que tiene una mayor concentración de anticuerpos de, por ejemplo, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 gramos por litro;

50 una diafiltración de la segunda preparación de anticuerpos resultante para proporcionar una preparación de anticuerpos diafiltrada intermedia como el retenido, que tiene aproximadamente la misma concentración que el retenido de la segunda preparación de anticuerpos resultante, es decir, diafiltrar para llevar a cabo un intercambio del tampón a un volumen constante; y

una segunda ultrafiltración de la preparación de anticuerpos intermedia diafiltrada para proporcionar una tercera preparación de anticuerpos como el retenido, que tiene una concentración de anticuerpos mayor de, por ejemplo, aproximadamente 150 a aproximadamente 200 gramos por litro.

55 Los procesos preparativos de la divulgación pueden comprender además una etapa o etapas opcionales de recuperación de producto por ejemplo, y como se divulga y se ilustra en el presente documento.

60 En realizaciones del proceso anteriormente mencionado de la divulgación, una o más de la primera ultrafiltración, la diafiltración, y la segunda ultrafiltración, se pueden llevar a cabo a, por ejemplo, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C. En realizaciones, estas etapas también se pueden llevar a cabo a, por ejemplo, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C. En realizaciones, estas etapas también se pueden llevar a cabo a, por ejemplo, de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 50 °C. En realizaciones, estas etapas también se pueden llevar a cabo a, por ejemplo, aproximadamente 45 °C, tal como de aproximadamente 45 °C más o menos 5 °C. Dependiendo del tipo de preparación de anticuerpos, para los procesos que se llevan a cabo a la temperatura por encima de aproximadamente 70 °C, la preparación puede mostrar signos de deterioro, tales como desnaturalización, aglomeración, y fenómenos similares. Para los procesos que se llevan a cabo a temperaturas por

debajo de aproximadamente 30 a aproximadamente 35 °C, las velocidades de flujo son normalmente indeseablemente bajas y los tiempos de proceso son indeseablemente largos, haciendo el proceso a menores temperaturas menos atractivo para la producción comercial eficaz.

5 La primera preparación de anticuerpos puede tener una concentración de anticuerpo de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 gramos por litro (g/l). La concentración de anticuerpos es, por ejemplo, una concentración común normalmente disponible de otras etapas o métodos preliminares de purificación de proteínas o anticuerpos, tales como, centrifugación, filtración, cromatografía, y procedimientos similares. La segunda preparación de anticuerpos resultante obtenible de la primera ultrafiltración puede tener una concentración de anticuerpos de, por ejemplo, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 gramos por litro, y por ejemplo, de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 gramos por litro, tal como 30 gramos por litro. Un intervalo para la concentración de anticuerpos de la preparación de anticuerpos intermedia puede depender de, por ejemplo, un equilibrio de factores, tales como el volumen de muestra y el flujo de muestra alcanzable con un tampón particular que contiene la segunda preparación de anticuerpos. La preparación de anticuerpos intermedia puede tener una concentración de anticuerpos de, por ejemplo, aproximadamente 25 a aproximadamente 35 gramos por litro y la tercera preparación de anticuerpos puede tener una concentración de anticuerpos de, por ejemplo, aproximadamente 170 a aproximadamente 200 gramos por litro. La tercera preparación de anticuerpos, en realizaciones, puede tener una concentración de anticuerpos de, por ejemplo, aproximadamente 50 a aproximadamente 250 gramos por litro, tal como de aproximadamente 100 a aproximadamente 230 gramos por litro, y de aproximadamente 170 a aproximadamente 200 gramos por litro, tal como 185 gramos por litro.

25 Será aparente para un experto en la materia, en la comprensión de la presente divulgación, que la preparación de anticuerpos intermedia y la tercera preparación de anticuerpos comprenden el mismo retenido ultrafiltrado excepto por, por ejemplo, diferencias en la concentración de anticuerpos resultantes de la primera y la segunda concentración por ultrafiltración, y diferencias en los medios tamponados de suspensión resultantes del intercambio de tampón de la diafiltración. Por lo tanto, existe poco, si es que hay algún, cambio composicional, tal como degradación, de la proteína diana o producto del anticuerpo, en realizaciones de la presente divulgación.

30 Los métodos convencionales de concentración por ultrafiltración pueden tener generalmente mayores tiempos y menores eficiencias de rendimiento teniendo tiempos de proceso considerablemente más largos tales como de varios días a varias semanas, procesar volúmenes considerablemente más pequeños, o ambos.

35 En realizaciones, el proceso de concentración de proteínas de la divulgación puede llevarse a cabo en, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 10 horas, preferentemente en de aproximadamente 2 a 5 horas, y más preferentemente en aproximadamente 3 horas. Las preferencias favorecen rendimientos de flujo mayores y áreas de membrana más pequeñas.

40 La primera ultrafiltración se puede llevar a cabo, por ejemplo, en aproximadamente el 35 por ciento del tiempo total de proceso. Por lo tanto, por ejemplo, en un proceso de concentración y purificación de la divulgación con aproximadamente 3 horas de tiempo total del proceso, la primera ultrafiltración se puede llevar a cabo en aproximadamente 45 minutos. La segunda ultrafiltración puede llevarse a cabo, por ejemplo, en aproximadamente el 15 por ciento del tiempo total del proceso. Por lo tanto, por ejemplo, en un proceso de la divulgación con aproximadamente 3 horas de tiempo total del proceso, la segunda ultrafiltración se puede llevar a cabo en aproximadamente 15 minutos. La diafiltración se puede llevar a cabo, por ejemplo, en aproximadamente el 50 por ciento del tiempo total del proceso. Por lo tanto, por ejemplo, en un proceso de la divulgación con aproximadamente 3 horas de tiempo total del proceso, la diafiltración se puede llevar a cabo en de aproximadamente 90 a aproximadamente 120 minutos.

50 En realizaciones, la primera ultrafiltración y la segunda ultrafiltración se puede llevar a cabo, por ejemplo, con una membrana de ultrafiltración que tenga un tamaño de poro nominal, o un punto de corte de peso molecular, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kiloDaltons. Otro tamaño de poro nominal adecuado es, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 kiloDaltons. Aún otro tamaño de poro nominal, o punto de corte de peso molecular adecuado, es de aproximadamente 30 kiloDaltons.

55 En realizaciones, la primera preparación de anticuerpos puede contener, por ejemplo, un anticuerpo que tenga un peso molecular aparente de, por ejemplo, aproximadamente 100 a aproximadamente 200 kiloDaltons. En otras realizaciones, la primera preparación de anticuerpos puede contener un anticuerpo que tenga un peso molecular aparente de, por ejemplo, aproximadamente 150 kiloDaltons, tal como cuando las preparaciones de anticuerpos comprenden anticuerpo anti-IgE o IgE, véase por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nº 6.172.213 asignada a Genentech, Inc.

65 Otros anticuerpos adecuados para el uso en la presente divulgación incluyen anticuerpos para tratar cáncer, véase en general, por ejemplo: los documentos PCT/US02/19592; PCT/US01/20118; PCT/US01/25464; PCT/US01/26626; PCT/US02/28859; PCT/US02/41798; PCT/US02/12206; PCT/US03/11148; PCT/US02/12619; y PCT/US02/33050. Aún otros anticuerpos adecuados para el uso en la presente divulgación incluyen un anticuerpo anti-CD20 y anticuerpos similares incluyendo formas humanas, no humanas, murinas, híbridas y quiméricas. Véase por ejemplo

la Patente de EE.UU. N° 6.582.959 (VEGF) y la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2002/0122797 A1 (VEGF humano).

5 En realizaciones, los anticuerpos incluidos dentro del alcance de la divulgación incluyen anticuerpos híbridos y recombinantes (por ejemplo, anticuerpos “humanizados” y “humanos”) sin importar la especie de origen o la designación de clase o subclase de inmunoglobulina, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, y F_v). Véase la Patente de EE.UU. N° 4.816.567; Mage y Lamoyi, en *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 79-97, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987).

10 Los anticuerpos monoclonales también se pueden usar y se pueden aislar de fagotecas de anticuerpos usando las técnicas descritas en Clackson *et al* (1991) *Nature*, 352: 624-628 y Marks, *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597, por ejemplo. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos “quiméricos” en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que la cadena o cadenas restantes son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que estos muestren la actividad biológica deseada (Patente de EE.UU. N° 4.816.567; y Morrison, *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81: 6851-6855). Los anticuerpos quiméricos pueden incluir anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión antigénica del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio etc.) y secuencias de la región constante humanas.

15 Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un solo sitio antigénico. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpos policlonales que pueden incluir distintos anticuerpos que se dirigen contra distintos determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se pueden sintetizar sin contaminarse por otros anticuerpos. Por lo tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como el que se obtiene de dicha población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores, y no se interpreta que requieran la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para el uso en la divulgación pueden hacerse usando el método del hibridoma que se describió por primera vez por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden hacerse por métodos de ADN recombinante. Otros métodos conocidos de producción de anticuerpos se describen, por ejemplo, en Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103, Academic Press (1986); Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984). Brodeur, *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 51-63, Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1987).

20 Se han empleado diversos métodos para producir anticuerpos monoclonales (“Mab”, del inglés “Monoclonal Antibody”). La tecnología del hibridoma, que se refiere a una línea celular clonada que produce un solo tipo de anticuerpos, usa las células de diversas especies, incluyendo ratones (murinas), hámsteres, ratas y seres humanos. Otro método para preparar los MAb usa la ingeniería genética incluyendo las técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales hechos a partir de estas técnicas incluyen, entre otros, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Un anticuerpo quimérico combina regiones de ADN codificante de más de un tipo de especie. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede derivar de la región variable de un ratón y la región constante de un ser humano. Un anticuerpo humanizado proviene predominantemente de un ser humano, a pesar de que contiene porciones no humanas. Como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado puede contener una región constante completamente humana. Pero a diferencia de un anticuerpo quimérico, la región variable puede derivar parcialmente de un ser humano. Las porciones no humanas, sintéticas, de un anticuerpo humanizado habitualmente provienen de las CDR de los anticuerpos murinos. En cualquier caso, estas regiones son cruciales para permitir que el anticuerpo reconozca y se una a un antígeno específico.

25 Como se observa, los anticuerpos murinos juegan un papel importante en la tecnología de anticuerpos. Mientras que son útiles para el diagnóstico y para terapias a corto plazo, los anticuerpos murinos no pueden administrarse a personas durante un tiempo largo sin aumentar el riesgo de una respuesta inmunogénica perjudicial. Esta respuesta, denominada de anticuerpo humano anti-ratón “Human Anti-mouse Antibody” (HAMA), ocurre cuando un sistema inmune humano reconoce el anticuerpo murino como extraño y lo ataca. Una respuesta HAMA puede causar choque tóxico o incluso la muerte. Los anticuerpos quiméricos y humanizados reducen la probabilidad de una respuesta HAMA minimizando las porciones no humanas de los anticuerpos administrados. Además, los anticuerpos quiméricos y humanizados tienen el beneficio adicional de activar respuestas inmunes humanas secundarias, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

30 Un anticuerpo “intacto” es uno que comprende una región variable de unión antigénica así como un dominio constante de la cadena ligera (CL) y los dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de la secuencia de aminoácidos de los mismos. El anticuerpo intacto puede tener una o más “funciones efectoras” que se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una variante de la secuencia de aminoácidos de la región Fc) de un anticuerpo. Los ejemplos de

las funciones efectoras de un anticuerpo incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), etc.

5 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a distintas "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las distintas clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras y configuraciones tridimensionales de las subunidades de las distintas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

10 En realizaciones, la primera ultrafiltración concentra la primera preparación de anticuerpos para proporcionar la segunda preparación de anticuerpos que tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 30 gramos por litro, y la segunda ultrafiltración concentra la preparación de anticuerpos intermedia (obtenida de la diafiltración) para proporcionar la tercera preparación de anticuerpos que tiene una concentración de anticuerpos de, por ejemplo, aproximadamente 170 a aproximadamente 200 gramos por litro. La primera ultrafiltración y la segunda ultrafiltración se pueden llevar a cabo con la misma membrana de ultrafiltración y, si se desea, dentro del mismo recipiente o circuito de proceso, por ejemplo, para minimizar la manipulación, las pérdidas, fugas, e impactos similares en el rendimiento, eficacia, y rentabilidad. La primera ultrafiltración y la segunda ultrafiltración se pueden llevar a cabo con cualquier aparato de ultrafiltración o membrana de ultrafiltración adecuada. Numerosos aparatos de ultrafiltración y membranas de ultrafiltración adecuadas, que son capaces de operar en filtración de flujo tangencial (FFT) para llevar a cabo las ultrafiltraciones y la diafiltración, están comercialmente disponibles, tales como las de Millipore, Pall Corp., Sartorius, y distribuidores similares. En realizaciones, una membrana de ultrafiltración adecuada puede ser, por ejemplo, cualquiera que esté compuesta de celulosa regenerada, cuya composición tenga un perfil relativamente bajo de adsorción de proteínas en comparación con otras membranas de ultrafiltración disponibles, tales como, polietersulfona.

15 La operación de diafiltración intercambia una primera composición tampón presente en la primera y en la segunda preparación de anticuerpos por un segundo tampón deseado en la tercera preparación de anticuerpos. En realizaciones, el primer tampón puede comprender, por ejemplo, una mezcla acuosa de cloruro de sodio y un tampón TRIS, y el segundo tampón puede comprender, por ejemplo, una mezcla acuosa de cloruro de histidina y cloruro de arginina. La diafiltración puede llevar a cabo un intercambio de tampón a volumen constante, concentración constante o ambos. En realizaciones, la diafiltración lleva a cabo un intercambio de tampón a un volumen constante y concentración constante. La diafiltración puede llevar a cabo un intercambio de tampón, por ejemplo, de desde aproximadamente 5 a aproximadamente 15 veces el volumen (es decir diavolumenes). La diafiltración también puede llevar a cabo un intercambio de tampón, por ejemplo, de aproximadamente 8 veces el volumen (8 diavolumenes), es decir, 8 veces el volumen de la muestra que contiene la preparación de anticuerpos para intercambiar. Por ejemplo, una preparación de 10 litros de anticuerpos puede diafiltrarse con 5 veces el volumen (diavolumenes) o 50 litros de tampón de intercambio. El volumen de intercambio y las preferencias de volúmenes de intercambio consideran un equilibrio de factores, por ejemplo, las eficacias de rendimiento de proceso, pureza del producto, normas de aceptabilidad gubernamentales y del cliente o paciente, y normas similares, y puede depender de, por ejemplo, la concentración y tipo de tampón (por ejemplo, el primer tampón) de la primera preparación de anticuerpos, y consideraciones similares.

20 La primera ultrafiltración, la segunda ultrafiltración, y la diafiltración se llevan a cabo preferentemente con filtración de flujo tangencial (modo FFT) a lo largo de una membrana de ultrafiltración, la membrana de ultrafiltración preferentemente es la misma membrana para cada etapa. El rendimiento del producto de la combinación final (es decir, la tercera preparación de anticuerpos) puede ser, por ejemplo, mayor de aproximadamente el 70 por ciento en peso, tal como de aproximadamente el 80 a aproximadamente el 100 por cien en peso basándose en el peso de los anticuerpos de la primera preparación de anticuerpos. El rendimiento de la tercera preparación de anticuerpos puede ser, en realizaciones, mayor de aproximadamente el 90 % en peso, en realizaciones, mayor de aproximadamente el 95 % en peso, y en realizaciones, incluso mayor de aproximadamente el 98 % en peso, basándose en el peso de los anticuerpos de la primera preparación de anticuerpos.

25 La primera ultrafiltración puede tener una velocidad de recirculación de, por ejemplo, aproximadamente 50 a 1.000 ml/minuto, y preferentemente de aproximadamente 100 a 1.000 ml/minuto. La velocidad de recirculación puede estar en una escala de acuerdo con el área de la membrana disponible, por ejemplo, áreas de membrana de 0,46, 1,85, 18,58, 92,90 m², y áreas similares permiten cada vez mayores velocidades de recirculación. Por lo tanto, una velocidad de recirculación en una escala adecuada, en realizaciones, puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5,38 l/min/m² a aproximadamente 53,82 l/min/m². La ultrafiltración y diafiltración se pueden llevar a cabo, por ejemplo, a presiones transmembrana de desde aproximadamente 34,47 a aproximadamente 344,74 kPa. La ultrafiltración y diafiltración se pueden llevar a cabo, por ejemplo, a presiones transmembrana de desde aproximadamente 68,95 a aproximadamente 322,77 kPa. En realizaciones de la presente divulgación se proporciona un proceso para preparar un concentrado de anticuerpos para una formulación de anticuerpos más diluida, teniendo el concentrado de anticuerpos una carga biológica mínima, por ejemplo, menor que o por debajo de un límite detectable, tal como, menor de aproximadamente 100 UFC/ml.

Las composiciones de anticuerpos de la divulgación pueden ser, por ejemplo, preparaciones de anticuerpos monoclonales concentradas para la administración a seres humanos, tales como a una concentración mayor que o igual a aproximadamente 100 g/l (mg/ml), tal como de aproximadamente 120 a aproximadamente 170 g/l.

5 Las composiciones de anticuerpos de la divulgación pueden ser, por ejemplo, inmunoglobulinas, tales como las del grupo de IgA, IgD, IgE, IgG e IgM; subclases de las mismas; recombinantes de las mismas; fragmentos de las mismas; y mezclas de las mismas de cualquiera de las anteriores. Una composición de anticuerpos preferida de la divulgación incluye anticuerpos recombinantes humanizados anti-IgE. Las composiciones de anticuerpos de la divulgación pueden incluir un tampón. Un tampón preferido puede ser, por ejemplo, una mezcla acuosa de cloruro de histidina y cloruro de arginina.

Los procesos preparativos de la divulgación preferentemente se llevan a cabo en el mismo aparato y sin intervención del operario o con mínima intervención del operario, por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 1.

15 La primera preparación de anticuerpos puede proporcionarse o prepararse usando diversos métodos químicos, físicos, mecánicos o no mecánicos, o bioquímicos, tales como, molienda, ultrasonificación, homogeneización, digestión enzimática, extracción por disolvente, centrifugación, cromatografía, y métodos similares, y combinaciones de los mismos, véase por ejemplo, el anteriormente mencionado R. Hatti-Kaul *et al.*, "Downstream Processing in Biotechnology," en Basic Biotechnology, Capítulo 9. La tercera preparación de anticuerpos puede procesarse adicionalmente, si se desea, usando por ejemplo, nanofiltración (para eliminar, por ejemplo, iones divalentes), ósmosis inversa (para eliminar, por ejemplo, iones monovalentes), y métodos de purificación de líquidos similares. La tercera preparación de anticuerpos de la presente divulgación puede envasarse, almacenarse, o usarse directamente. La tercera preparación de anticuerpos puede procesarse adicionalmente, si se desea, usando por ejemplo, etapas de concentración adicionales, tales como secado, liofilización, liofilización-reconstitución, y métodos similares. El tercer producto de anticuerpo concentrado resultante puede reconstituirse más tarde, si se desea, con un líquido adecuado.

En referencia a las figuras, la FIG. 1 ilustra un aparato, en realizaciones de la presente invención, para llevar a cabo el proceso preparativo que incluye un sistema de ultrafiltración-diafiltración (100) que tiene una unidad de ultrafiltración-diafiltración (UF-DF) FFT (110), que tiene una membrana UF-DF (115), que está comunicada con el tanque de recirculación (120) cuyo tanque sirve como una alimentación principal y un depósito de retención. En realizaciones, el tanque (120) puede tener un sistema de control de la temperatura que comprende, por ejemplo, un recubrimiento aislante (125), un elemento de calentamiento termostático o de temperatura controlada (126), tal como un elemento calentador reostático resistivo o un sistema de líquido caliente circulante que incluye un calentador (no mostrado), un regulador de flujo (127), tal como una bomba de recirculación, y un líquido de transferencia de calor adecuado, tal como bien agua, glicoles, o mezclas de los mismos. Todos los componentes del circuito o componentes que contribuyen al flujo o procesamiento en el circuito, tales como tuberías, válvulas, bombas, tanques, y componentes similares, pueden aislarse opcionalmente o adaptarse opcionalmente para el calentamiento externo para mantener un control estricto sobre las especificaciones de temperatura y evitar excursiones de temperatura en el bucle de fluido recirculante dentro y entre la cámara de filtración (110) y el tanque de recirculación (120). En realizaciones, por ejemplo, cuando el sistema (100) está llevando a cabo la primera ultrafiltración o primer ultrafiltrado, tal como en un modo semi-continuo el sistema puede incluir un tanque de alimentación opcional (128) que está en comunicación fluida con el tanque de recirculación de alimentación (120) y puede usarse para, por ejemplo, componer, reponer o proporcionar la fase líquida empobrecida a partir del tanque de recirculación (120).

Una bomba (130) bombea el líquido de alimentación del tanque (120) a través de la unidad UF/DF (110) y posteriormente recircula el retenido resultante (la porción no filtrada o excluida de la membrana del líquido de alimentación) al tanque de recirculación (120). Un segundo tanque (140) mantiene y opcionalmente bombea (no mostrado) un tampón al circuito principal (bucle 110-120) durante la diafiltración a volumen constante. Por ejemplo, la velocidad de adición y el volumen de tampón introducido en el circuito principal preferentemente están a la misma velocidad y volumen a la que el filtrado deja el circuito principal a través de la membrana (115). El tanque de tampón (140) puede aislarse opcionalmente con un recubrimiento (143) y puede incluir el equivalente del elemento de calentamiento anteriormente mencionado y una bomba de recirculación (no mostrado). Se pueden usar una fuente opcional de gas inerte (145), tal como nitrógeno, u otras fuentes de gas comprimido, por ejemplo, para recuperar el producto, para presurizar el retorno del retenido, excluir oxígeno, para lavar, para limpiar, para ensayar la integridad de la membrana, y operaciones similares. Un tercer tanque (160) se usa para recoger y recuperar el filtrado que sale de la unidad (110). Las válvulas (150, 170) se pueden usar tal como sea apropiado para regular la dirección y opcionalmente la velocidad de flujo del líquido en el sistema. Todos los valores y bombas pueden accionarse manualmente, por control coordinado por ordenador, o ambos. Un cuarto tanque opcional (190) y una corriente de salida pueden proporcionar un lavado de residuos, recuperación de producto, o sistema de control auxiliar, por ejemplo, cuando se equipa con un dispositivo de control opcional (180), tal como un densímetro óptico, filtro o filtros opcionales (185) tales como un filtro protector, filtro de producto, y subsistemas opcionales similares. En realizaciones, el circuito de fluido principal (bucle 110-120) puede equiparse adicionalmente con un sistema de control en línea.

65

Las preparaciones de anticuerpos concentradas preparadas por procesos de la presente divulgación pueden usarse para la administración terapéutica en seres humanos, incluyendo productos de inmunoglobulina, bien para administración intramuscular (IMIG) o intravenosa (IVIG). Las preparaciones de anticuerpos concentradas de la divulgación pueden incluir un estabilizante, por ejemplo, una solución salina tamponada de aminoácidos, azúcares simples, o estabilizantes similares, quelantes de iones adecuados, tales como EDTA o ion citrato, y combinaciones de los mismos, véase por ejemplo, Wang, Y.-C. J. *et al*, "Parenteral formulations of proteins and peptides: stability and stabilizers," J. Parenteral Sci. Technol., 42, Supl. S3-S26 (1988). El resumen de Derwent del documento JP01268646A (AN89-359879) notifica que la solicitud describe una preparación para inyección de un anticuerpo monoclonal de IgG₃ que tiene una concentración de 0,1 microgramos/ml a 100 mg/ml. Se cree que el objeto divulgado en estas publicaciones está fuera del alcance de la presente divulgación.

Las preparaciones de acuerdo con la divulgación pueden estar sustancialmente libres de agregados. Los niveles aceptables de contaminantes agregados podrían ser menores de, por ejemplo, aproximadamente el 5 % en peso, e idealmente menores del 2 % en peso. Se pueden alcanzar niveles tan bajos como el 0,2 % en peso, aunque es más típico que los contaminantes agregados sean de aproximadamente el 1 % en peso. La preparación en realizaciones, preferentemente también puede estar libre de excipientes tradicionalmente usados para estabilizar formulaciones policlonales, por ejemplo glicina y/o maltosa.

La presente divulgación puede proporcionar una preparación de anticuerpos monoclonales para la administración a un ser humano caracterizada por que el anticuerpo de la preparación es un anticuerpo recombinante y puede estar a una concentración de 100 mg/ml o mayor, preferentemente mayor de 150 mg/ml. La preparación está preferentemente libre de cualquier agregación proteica.

El pH de las formulaciones farmacéuticas de la divulgación dependerá de la ruta particular de administración. Sin embargo, a fin de maximizar la solubilidad del anticuerpo en la solución concentrada, el pH de la solución debería ser distinto del pH del punto isoeléctrico (pI) del anticuerpo.

En realizaciones de la divulgación, la preparación monoclonal puede estar prevista para uso en terapia en seres humanos. Se pueden tratar diversos trastornos humanos tales como cáncer o enfermedades infecciosas, por ejemplo, los anteriormente mencionados, y disfunciones inmunes tales como trastornos mediados por linfocitos T incluyendo vasculitis grave, artritis reumatoide, lupus sistémico, también trastornos autoinmunes tales como esclerosis múltiple, enfermedad de injerto frente a hospedador, psoriasis, diabetes de aparición juvenil, síndrome de Sjogren, enfermedad tiroidea, miastenia grave, rechazo de trasplantes, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, trastornos mediados por IgE, y trastornos y afecciones similares, o combinaciones de los mismos.

La divulgación por lo tanto proporciona en realizaciones el uso de una preparación de anticuerpos monoclonales concentrada como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquiera de los trastornos anteriormente mencionados, y trastornos similares. También se proporciona un método para tratar a un ser humano, que tenga cualquiera de dichos trastornos, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de acuerdo con la divulgación. Las dosificaciones de dichas preparaciones de anticuerpos variarán con las afecciones que se tratan y el receptor del tratamiento, pero pueden estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 2.000 mg para un paciente adulto preferentemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 mg administrados diariamente o semanalmente durante un periodo de entre 1 y 30 días, y repetirse si es necesario. Las dosis pueden administrarse como una sola o como dosis múltiples.

Descripción del proceso. La etapa de formulación normalmente intercambia la sustancia farmacológica purificada del grueso, por ejemplo, resultante de la cromatografía de intercambio iónico, en la composición y concentración final de excipiente. Normalmente no se alcanzó purificación en esta etapa excepto por la eliminación de pequeñas moléculas. El énfasis estuvo en el alto rendimiento, intercambio de tampón, y robustez de la etapa de formulación. Durante la formulación por medio de FFT (filtración de flujo tangencial), la solución de alimentación que contiene proteínas se bombeó a través del sistema de membrana y volvió al recipiente de reciclado (recirculación). La membrana FFT retuvo la proteína (como parte del retenido) mientras que el filtrado (o permeado) se condujo a través de la membrana por presión. La presión se denomina presión transmembrana (PTM) y normalmente se controla usando una válvula de control de la presión del retenido. El proceso se llevó a cabo habitualmente por una secuencia de una primera ultrafiltración (concentración), diafiltración (intercambio de tampón a volumen constante), y una segunda ultrafiltración (concentración adicional). El número de diavólmenes (equivalentes volumétricos) necesario para eliminar los componentes del tampón del proceso puede calcularse fácilmente o determinarse experimentalmente.

Proceso UF/DF generalmente para anti-IgE. El pH de un conjunto de cromatografía de intercambio aniónico se ajustó a un pH de aproximadamente 6 usando ácido fosfórico acuoso 0,5 M. El conjunto de intercambio aniónico de pH ajustado se formuló por el proceso de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) de la presente divulgación usando una membrana que tenía un punto de corte molecular nominal de 10.000 a 30.000 Daltons. Antes del procesamiento, la membrana UF se equilibró con tampón de diafiltración (histidina 0,02 M, arginina-HCl 0,2 M, pH 6).

5 El producto de un intercambio aniónico (conjunto de intercambio aniónico) se cargó después en el sistema y se concentró a una concentración intermedia mediante la primera ultrafiltración. El conjunto se diafiltró después (8 X o diavolumenes) en su formulación (histidina 0,02 M, arginina-HCl 0,2 M, pH 6). Después se concentró el conjunto mediante una segunda ultrafiltración a una concentración final del grueso de >170 g/l y se recuperó a través de un filtro estéril de 0,22 micrómetros. El proceso UF/DF completo se realizó a un punto de referencia de la temperatura de aproximadamente 45 grados C. Este control de la temperatura se alcanzó usando el control de temperatura del conjunto de intercambio aniónico entrante, tampón de diafiltración, y el uso de un recipiente de recirculación recubierto para el proceso UF/DF como se ilustra en el presente documento.

10 Después de la UF/DF, el conjunto recuperado se diluyó (es decir, se acondicionó), a una concentración del grueso de aproximadamente 150 g/l en histidina 0,02 M, arginina-HCl 0,2 M, polisorbato-20 al 0,04 %, pH 6 (formulación final). Durante las etapas de acondicionamiento se permitió que la temperatura del grueso regresara a la temperatura ambiente. Después del acondicionamiento, el grueso del formulado se recuperó otra vez a través de un filtro estéril de 0,22 micrómetros.

15 El sistema UF/DF se puede regenerar con hidróxido de sodio 0,1 N y desinfectarse con Minncare® al 1,4 %. Cuando el sistema no está en uso se puede almacenar en hidróxido de sodio acuoso 0,1 N. Las membranas UF/DF pueden almacenarse, por ejemplo, en una solución de Roccal® al 0,1 %/glicerol-agua al 20 % entre campañas.

20 **Procedimientos generales del proceso de ultrafiltración/diafiltración**

Parámetros operativos: velocidad de flujo de alimentación a 5,38 l/min/m². Se usó un control constante de la presión del retenido (por ejemplo, 68,95 kPa) para limpiar y equilibrar antes del uso, mientras que se usó una presión constante de retenido, C_{wall}, o PTM constante para el procesado.

25 Equilibrado anterior al uso: las siguientes preparaciones se llevaron a cabo en casetes de membrana Pellicon-2 limpias antes de usarlas para asegurar que las membranas estuvieran equilibradas apropiadamente.

| Volumen (l/m ²) | Solución (temperatura ambiente) | Modo |
|-----------------------------|---------------------------------|------------------|
| - | - | SPFA |
| 10,76 | WFI | SPFA |
| 10,76 | tampón DF | SPFA |
| 5,38 | Tampón DF | RTFA, 10 minutos |
| - | - | SPFA |

30 Uso del proceso: se realizó lo siguiente en el conjunto de intercambio aniónico inicial resultante (conjunto Q) obtenido de una etapa de separación anterior, por ejemplo, una etapa de cromatografía en Q-Sepharose:

35 una primera ultrafiltración o primer ultrafiltrado (UF1) a una concentración de aproximadamente 5 g/l con respecto a una concentración para diafiltración (C_{DF});
 diafiltración o diafiltrado (DF1) con (4) volúmenes de diafiltración (VD) con el tampón DF;
 seguido por una diafiltración (DF2) con cuatro (4) volúmenes de diafiltración (DV) de tampón DF;
 una segunda ultrafiltración o segundo ultrafiltrado (UF2) a una concentración final (C_{Final}); y
 recuperación del producto opcional.

40 Las etapas anteriores normalmente se llevaron a cabo a un dP de Reciclado (mezcla) bajo, por ejemplo, 15 minutos.

Limpieza posterior al uso: la siguiente secuencia de la tabla y condiciones se usaron para la limpieza de los casetes de membrana Pellicon-2 inmediatamente después del uso.

| Volumen (l/m ²) | Solución (temperatura ambiente) | Modo |
|-----------------------------|---------------------------------|------------------|
| 10,76 | NaOH 0,1 N | SPFA |
| 5,38 | NaOH 0,1 N | RTFA, 30 minutos |
| - | - | SPFA |
| 10,76 | WFI | SPFA |
| 5,38 | Minncare® 300 ppm | RTFA, 30 minutos |

| | | |
|-------|------------|------------------------------------|
| - | - | SPFA |
| 10,76 | WFI | SPFA |
| - | - | Ensayo de Integridad a 206,84 kPa |
| 5,38 | NaOH 0,1 N | RTFA, 15 minutos de almacenamiento |

Definiciones para los modos operativos en FFT.

5 Un Solo Pase con Filtrado Abierto (SPFA). El retenido y el filtrado se dirigen al drenaje. Válvula de filtrado abierta.

Reciclado Total con Filtrado Abierto (RTFA). El retenido y el filtrado se dirigen al recipiente de reciclado. Válvula de filtrado abierta.

10 Ultrafiltración Semi-continua (USC). El retenido se dirige al tanque de reciclado, el filtrado se dirige al drenaje, y el conjunto entrante se transfiere al tanque de reciclado.

Ultrafiltración Discontinua (UD). El retenido se dirige al tanque de reciclado y el filtrado se dirige al drenaje.

15 Diafiltración (DF). El retenido se dirige al tanque de reciclado, el filtrado se dirige al drenaje, y el tampón de diafiltración se transfiere al tanque de reciclado.

dP se refiere al diferencial de presión.

20 Transferencia de Producto. La unidad de membrana de ultrafiltración y el tanque de reciclado se abren al tanque de reserva. La presión se superposición de nitrógeno está controlada. El conjunto se transfiere primero usando la bomba de reciclado y después usando una bomba peristáltica manual.

Transferencia de Alimentación. El conjunto entrante se bombea al tanque de reciclado.

25 Reciclado Total con Filtrado Cerrado (RTFC). El retenido se dirige a un recipiente de reciclado. Válvula de filtrado cerrada.

30 "Conjunto Q" se refiere al conjunto de proteínas resultante de, por ejemplo, una etapa de cromatografía de Q-Sepharose anterior que se ha acondicionado con tampón, también mencionado como el "conjunto acondicionado".

WFI se refiere a agua para inyección.

Ejemplos

35 Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente la manera de usar la divulgación anteriormente descrita, así como para establecer los mejores modos contemplados para llevar a cabo diversos aspectos de la divulgación. Se entiende que estos ejemplos no servirán de ninguna manera para limitar el verdadero alcance de esta divulgación, sino que más bien se representan para fines ilustrativos.

40 Ejemplo 1

Formulación de alta concentración de rhuMAb E25 Se usó un sistema UF de escala piloto para concentrar/formular el rhuMAb E25 (un anticuerpo monoclonal humano recombinante que se dirige a IgE, Pat. EE.UU. 6.172.213). Se ensambló un sistema de Ultrafiltración/diafiltración de Millipore Pelicon con una membrana compuesta de celulosa regenerada de 0,52 metros cuadrados y 10.000 daltons. El sistema consistía en un soporte de membrana, una bomba de alimentación de 6 lóbulos rotatorios Modelo Waukeskaw, tuberías de recirculación de acero inoxidable 316L de 1,27 cm, y un recipiente de recirculación. Los indicadores de presión/transmisores (Anderson) se localizaron en la entrada (ALIMENTACIÓN), salida (RETENIDO) y permeado (FILTRADO) del soporte de membrana. Los medidores de flujo (Yokogawa ADMAG) se localizaron en la entrada (ALIMENTACIÓN) y permeado (FILTRADO) del soporte de membrana. Una válvula reguladora de contrapresión (Mikroseal) se localizó a la entrada del soporte de membrana para controlar la presión del retenido y el efecto de la presión transmembrana (PTM). Se usó un tanque recubierto de acero inoxidable 316L de 40 litros para el recipiente de recirculación. Este tanque se equipó con un indicador de nivel, un agitador montado en la parte superior (Lightnin), un interruptor de vórtice y una válvula inferior (NovAseptic). El control de temperatura se consiguió a través del uso de una alimentación de glicol de temperatura modulada al recubrimiento del tanque.

Durante esta ejecución, la velocidad del flujo de alimentación se estableció a una velocidad constante de 2,85 l/min (5,38 l/min/m²). Durante todas las operaciones antes y después del uso el control de la presión del retenido se

estableció a una constante de 68,95 kPa. Durante las operaciones de ultrafiltración y diafiltración el sistema usó un esquema de control C_{wall} para controlar el flujo a través de la membrana, véase por ejemplo R. van Reis, *et al.*, Constant C_{wall} Ultrafiltration Process Control, J. of Membrane Science, 130 (1997), 123-140.

5 Antes del proceso, la solución de almacenamiento del sistema (NaOH 0,1 N) se lavó en un solo pase hasta el modo de drenaje, primero con 21,53 l/m² de agua purificada (AP) y después con 10,76 l/m² de tampón de diafiltración (Histidina 50 mM / pH 6,0). Después de los lavados, el sistema se equilibró recirculando 5,38 l/m² de tampón de diafiltración durante 10 min. El pH de la solución recirculada se comprobó para confirmar el equilibrio. El nivel en el tanque se redujo después a un valor mínimo medible para minimizar la dilución del conjunto de proteínas entrante.
10 Se midió que el conjunto de proteínas resultante de una etapa de cromatografía de Q-Sepharose anterior era de 3,2 g de E25/l y tuvo un volumen de 43,1 l. La proteína estaba en una solución de tampón TRIS 25 mM y NaCl aproximadamente a 200 mM y el pH se ajustó a 6,2. Para comenzar la ejecución el conjunto de proteínas se transfirió al recipiente de recirculación. En el recipiente se agitó el conjunto por medio de una pala montada en la parte superior y se mantuvo a temperatura ambiente (20-25 °C).

15 Durante el proceso el conjunto se concentró en modo UF1 a 50 g de E25/l (aproximadamente 2,8 l). Al comienzo de la diafiltración el punto de referencia de la temperatura del recipiente de recirculación aumentó hasta 40 °C. El aumento de la temperatura y el control estaba afectado por el flujo de glicol caliente a través del recubrimiento externo del tanque. Después se diafiltró el conjunto con 8 diavolumenes de tampón de diafiltración. La diafiltración se realizó a un volumen constante, que se alcanzó haciendo coincidir la velocidad de flujo de la solución tamponada que se transfería al tanque de circulación con la velocidad de flujo del filtrado que se eliminaba del sistema. Al final de la diafiltración, el conjunto se concentró adicionalmente en modo UF2. Esta fase también se realizó usando un punto de referencia de la temperatura elevado de 40 °C. El objetivo de esta concentración final fue de 110 g/l. Este se alcanzó sin la necesidad de reducir la velocidad de flujo de alimentación. A continuación, se realizó una mezcla de bajo descenso de la presión en la que la bomba de alimentación se controló para mantener el descenso de la presión en 34,74-68,95 kPa a lo largo del canal de alimentación. Se retiró una muestra del tanque de recirculación y se midió una concentración del grueso final de aproximadamente 120 g/l. La tabla 1 resume los resultados de rendimiento y el flujo de UF1, DF (DF1+DF2) y UF2.

30

Tabla 1.

| Fase del Proceso | Rendimiento Normalizado (g/m ² /h) | Flujo Normalizado (LMH/kPa) |
|------------------|---|-----------------------------|
| UF1 | 148,54 | 0,72 |
| DF | 148,54 | 0,42 |
| UF2 | 1.952,58 | 0,24 |

35

La FIG. 2 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para los parámetros de velocidad de flujo de alimentación (210), temperatura del tanque (220), dP de alimentación (230), PTM (240) y velocidad de flujo del filtrado (250) durante las diversas fases o modos del proceso incluyendo UF1 (10), DF (20), UF2 (30).

40

La FIG. 3 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para la concentración (310), flujo (320) y PTM (240) de E25.

45

La FIG. 4 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para el descenso de presión frente a la concentración de proteínas observada para UF1 (410) y UF2 (420) a 37 °C.

50

Se recuperó el conjunto de proteínas por una serie de etapas. Primero el conjunto del tanque de recirculación se bombeó desde el tanque a través de un filtro para el uso en esterilización de 0,22 micrómetros Millipac 200, usando la bomba de alimentación de lóbulos rotatorios. A continuación la solución de proteínas se desplazó de las tuberías y de la unidad de membrana con una purga de nitrógeno gaseoso a 24,47 kPa aplicada en el punto más alto de la línea de retención. La fase final fue una purga del tanque y la línea de alimentación, usando también nitrógeno gaseoso a 24,47 kPa.

55

Se cree que la recuperación del producto mejoró en comparación con el Ejemplo 1 cuando se llevó a cabo a temperatura ambiente debido a que la temperatura elevada usada en una o más de las etapas de ultrafiltración, diafiltración, o recuperación redujo los efectos viscosos. Por ejemplo, cuando el control de la temperatura se apagó durante la recuperación del producto, el sistema se enfrió lentamente durante esta operación causando dificultades en la recuperación de la unidad de membrana. Como alternativa, la recuperación se puede realizar primero del soporte de membrana y después del recipiente de recirculación.

Para determinar la masa de las pérdidas durante la recuperación, se añadieron 1,74 l de tampón DF al sistema y se recircularon durante aproximadamente 5 minutos y se recuperaron usando la misma secuencia como se ha descrito

anteriormente. Este volumen se analizó después con respecto a la concentración de proteínas con los otros conjuntos. La tabla 2 resume los resultados.

Tabla 2.

| | Volumen (l) | Concentración (g/l) | Masa (g) | Rendimiento o {Pérdida} (%) |
|----------------------------|-------------|---------------------|----------|-----------------------------|
| Conjunto Q | 43,1 | 3,2 | 137,9 | 100 |
| Conjunto recuperado | 0,99 | 120 | 118,8 | 86,1 |
| Tampón de lavado | 1,74 | 9,8 | 17,1 | 12,4 |
| Filtrado | 65,3 | 0,04 | 2,6 | 1,9 |

Después del procesamiento, la membrana se regeneró usando NaOH 0,1 N, en un lavado de un solo pase de 10,76 l/m² seguido de 5,38 l/m² de recirculación total durante 30 minutos. A esto le siguió un lavado con 10,76 l/m² de AP (agua pura). A esto le siguió una recirculación total de 300 ppm de solución de Minncare[®] durante 30 minutos. El sistema se lavó otra vez con 10,76 l/m² de AP y finalmente se recirculó durante 15 minutos con NaOH 0,1 N y se almacenó. El conjunto recuperado se diluyó hasta 80 g de E25/l y se acondicionó en la formulación final de histidina 50 mM / trehalosa 150 mM / 0,02 % de polisorbato 20 / pH 6,0. La calidad del producto se evaluó por cromatografía de exclusión molecular (SEC) tanto para el conjunto Q entrante como para el grueso del Grueso Final recuperado. Estos datos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3.

| Conjunto | Resultados de SEC (% de monómeros) |
|---------------------|------------------------------------|
| Conjunto Q | 99,8 |
| Grueso Final | 99,8 |

Ejemplo comparativo 2

Formulación de alta concentración de rhuMAb E25 a temperatura ambiente

El ejemplo 1 se llevó a cabo con las siguientes excepciones. Antes del proceso, la solución de almacenamiento del sistema (NaOH 0,1 N) se lavó en un solo pase hasta el modo de drenaje primero con 21,53 l/m² de agua purificada (AP) y después con 10,76 l/m² de tampón de diafiltración (histidina 20 mM / pH 6,0). Después de los lavados, el sistema se equilibró recirculando 5,38 l/m² de tampón de diafiltración durante 10 minutos. El pH de la solución recirculada se comprobó para confirmar el equilibrio. El nivel del tanque se redujo después a un valor mínimo medible para minimizar la dilución del conjunto de proteínas entrante.

Se midió que el conjunto de proteínas resultante de la etapa de cromatografía de Q-Sepharose anterior era de 3,3 g de E25/l y tuvo un volumen de 33,3 l. La proteína estaba en una solución de tampón TRIS 25 mM y NaCl aproximadamente a 200 mM y el pH se ajustó a 6,2. Para comenzar la ejecución el conjunto de proteínas se transfirió al recipiente de recirculación. En el recipiente el conjunto se agitó por medio de una pala montada en la parte superior y se mantuvo a temperatura ambiente (20-25 °C). Durante el proceso el conjunto se concentró en modo UF1 hasta 50 g de E25/l (aproximadamente 2,2 l). El conjunto se diafiltró después con 8 diavolumenes del tampón de diafiltración. La diafiltración se realizó a volumen constante, cuyo volumen se alcanzó haciendo coincidir la velocidad de flujo del tampón que se transfería al tanque de circulación con la velocidad del flujo del filtrado que se eliminaba del sistema. La diafiltración también se realizó a temperatura ambiente. Al final de la diafiltración, el conjunto se concentró adicionalmente en modo UF2. El objetivo de esta concentración final fue de 110 g/l. Sin embargo, debido al gran descenso de la presión a lo largo del canal de alimentación, esta concentración no se alcanzó. En un intento de alcanzar esta concentración la velocidad de flujo de alimentación se redujo a 1,4 l/min a una concentración del grueso de aproximadamente 80 g de E25/l debido a que el descenso de la presión a lo largo del canal de alimentación había alcanzado los 344,74 kPa. UF2 continuó hasta que se alcanzó una disminución alta de la presión de 344,74 kPa nuevamente y el proceso se detuvo. A continuación, se intentó una mezcla con bajo descenso de la presión en la que la bomba de alimentación se usó para mantener un descenso de la presión de 34,47 kPa a lo largo del canal de alimentación. Nuevamente, la naturaleza viscosa de la solución de proteínas dificultó su consecución dado que la bomba de lóbulos rotatorios alcanzó presiones excesivas. Se retiró una muestra del tanque de recirculación y se midió una concentración del grueso final de aproximadamente 104 g/l. La tabla 4 resume el rendimiento y el flujo medidos durante las fases UF1, DF (DF1+DF2) y UF2.

Tabla 4.

| Fase del Proceso | Rendimiento Normalizado (g/m ² /h) | Flujo Normalizado (LMH/kPa) |
|------------------|---|-----------------------------|
| UF1 | 156,78 | 0,77 |
| DF | 102,26 | 0,21 |
| UF2 | 1.556,47 | 0,11 |

La FIG. 5 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para los parámetros de velocidad de flujo de alimentación (210), temperatura del tanque (220), dP de alimentación (230), PTM (240) y velocidad de flujo del filtrado (250) durante las distintas fases o modos del proceso incluyendo UF1 (10), DF (20), UF2 (30).

La FIG. 6 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para la concentración (310), flujo (320) y PTM (240) de E25.

La FIG. 7 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para el descenso de presión frente a la concentración de proteínas observada para UF1 (410) y UF2 (420) a 24 °C.

El conjunto de proteínas se recuperó por etapas. Primero, el conjunto del tanque de recirculación se bombeó del tanque a través de un filtro para uso en esterilización de 0,22 micrómetros Millipac 200, usando la bomba de alimentación de lóbulos rotatorios. A continuación la solución de proteínas se desplazó de las tuberías y la unidad de membrana con una purga de nitrógeno gaseoso a 34,47 kPa aplicada en el punto más alto de la línea de retención. La recuperación del producto de este fue muy pobre debido a la naturaleza viscosa de la solución. La fase final fue una purga del tanque y la línea de alimentación, usando también nitrógeno gaseoso a 34,47 kPa.

Para determinar la masa de las pérdidas durante la recuperación, se añadieron 1,85 l de tampón DF al sistema y se recircularon durante aproximadamente 5 minutos y se recuperaron usando la secuencia del Ejemplo 1. Este volumen se analizó después para la concentración de proteínas con los otros conjuntos. La tabla 5 resume los resultados.

Tabla 5.

| | Volumen (l) | Concentración (g/l) | Masa (g) | Rendimiento o {Pérdida} (%) |
|---------------------|-------------|---------------------|----------|-----------------------------|
| Conjunto Q | 33,3 | 3,3 | 109,9 | 100 |
| Conjunto recuperado | 0,77 | 104,4 | 80,4 | 73,1 |
| Tampón de lavado | 1,85 | 14,7 | 27,2 | 24,7 |
| Filtrado | 52,2 | 0,03 | 1,6 | 1,5 |

Después del proceso, la membrana se regeneró usando NaOH 0,1 N, con un lavado de un solo pase de 10,76 l/m² seguido de una recirculación total de 5,38 l/m² durante 30 minutos. A esto le siguió un lavado con 10,76 l/m² de AP. A esto le siguió una recirculación total de 300 ppm de solución Minncare[®] durante 30 minutos. El sistema se lavó de nuevo con 10,76 l/m² de AP y finalmente se recirculó durante 15 minutos con NaOH 0,1 N y se almacenó. El conjunto recuperado se diluyó hasta 80 g de E25/l y se acondicionó en la formulación final de histidina 20 mM / sacarosa 250 mM / 0,02 % de polisorbato 20 / pH 6,0. La calidad del producto se evaluó mediante una cromatografía de exclusión molecular (SEC) tanto para el conjunto Q entrante como para el grueso final recuperado. Estos datos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6.

| Conjunto | Resultados de SEC (% de monómeros) |
|--------------|------------------------------------|
| Conjunto Q | 99,8 |
| Grueso Final | 99,8 |

Ejemplo 3

Formulación de alta concentración de rhuMAb E26 con modo inicial semi-continuo

El ejemplo 1 se repitió con las siguientes excepciones. El concentrado/fórmula fue rhuMAb E26 (un anticuerpo monoclonal recombinante humano que se dirige a IgE). Los productos de este ejemplo se usaron en la evaluación toxicológica. El sistema de Ultrafiltración/Diafiltración de Millipore Pelicon se ensambló con una membrana

compuesta de celulosa regenerada de 1,06 metros cuadrados y 30.000 daltons. La velocidad de flujo de alimentación se estableció a una velocidad constante de 5,0 l/min (4,30 l/min/m²). Durante las operaciones de ultrafiltración y diafiltración la presión del retenido se mantuvo entre aproximadamente 41,37-55,16 kPa. Se midió que el conjunto de proteínas resultante de la etapa de cromatografía de Q-Sepharose anterior era de 6,7 g de E26/l y tuvo un volumen de 59,3 l.

Debido a que el conjunto entrante fue mayor que el recipiente de recirculación, el proceso UF comenzó en un modo semi-continuo. En este modo, se añadió el conjunto Q al recipiente de recirculación aproximadamente a la misma velocidad que el filtrado que pasaba a través de la membrana FFT hasta el drenaje. Después de que se transfiriera el conjunto Q restante al recipiente de recirculación, el proceso UF1 continuó en modo discontinuo. Durante la UF1 el conjunto se concentró hasta 50 g de E26/l (aproximadamente 7,9 l). Al comienzo de la diafiltración el punto de referencia de la temperatura del recipiente de recirculación aumentó hasta 40 °C. El aumento de la temperatura y el control estaban afectados por el flujo de glicol caliente a través del recubrimiento externo del tanque. Después se diafiltró el conjunto con 8 diavolúmenes de tampón de diafiltración. La diafiltración se realizó a un volumen constante que se alcanzó haciendo coincidir la velocidad de flujo del tampón que se transfería al tanque de circulación con la velocidad de flujo del filtrado que se eliminaba del sistema. Al final de la diafiltración, el conjunto se concentró adicionalmente en modo UF2 a una concentración final de 109 g de E26/l (3,6 l). Esta fase también se realizó usando un punto de referencia de la temperatura elevado de 40 °C. A continuación se realizó una mezcla con bajo descenso de presión en la que la bomba de alimentación se controló para mantener un descenso de la presión de 34,47-68,95 kPa a lo largo del canal de alimentación. La tabla 7 resume los resultados de rendimiento y flujo de UF1, DF (DF1+DF2) y UF2.

Tabla 7.

| Fase del Proceso | Rendimiento Normalizado (g/m ² /h) | Flujo Normalizado (LMH/kPa) |
|------------------|---|-----------------------------|
| UF1 | 280,94 | 0,54 |
| DF | 206,67 | 0,34 |
| UF2 | 1.874,09 | 0,26 |

La FIG. 8 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para los parámetros de la velocidad de flujo de alimentación (210), temperatura del tanque (220), dP de alimentación (230), PTM (240) y velocidad de flujo del filtrado (250).

La FIG. 9 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para la concentración (910), flujo (920) y PTM (940) de E26.

La FIG. 10 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para el descenso de presión frente a la concentración de proteínas observada para UF1 (1010) y UF2 (1020).

Inmediatamente antes de la recuperación del producto, se analizó una muestra de 10 ml para la detección y un título de la carga biológica. Un límite de rechazo típico es de 1.000 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml. Los resultados de este ensayo fueron de 1,8 UFC/ml, un valor adecuado en esta etapa y muy por debajo del límite de rechazo. Para determinar la masa de las pérdidas durante la recuperación, se añadieron 908,1 ml de tampón DF al sistema y se recircularon durante aproximadamente 5 minutos y se recuperaron usando la misma secuencia descrita anteriormente. Este volumen se analizó después para la concentración de proteínas con los otros conjuntos. La tabla 8 resume los resultados.

Tabla 8.

| | Volumen (l) | Concentración (g/l) | Masa (g) | Rendimiento o {Pérdida} (%) |
|---------------------|-------------|---------------------|----------|-----------------------------|
| Conjunto Q | 59,3 | 6,7 | 397,3 | 100 |
| Conjunto recuperado | 3,41 | 109,1 | 372,0 | 93,6 |
| Tampón de lavado | 0,908 | 20,4 | 18,5 | 4,7 |
| Filtrado | 120 | n/d | n/d | n/d |

El conjunto recuperado se diluyó hasta 80 g de E26/l y se acondicionó en la formulación final de histidina 50 mM / trehalosa 150 mm / 0,02 % de polisorbato 20 / pH 6,0. La calidad del producto se evaluó mediante una cromatografía de exclusión molecular (SEC) para el conjunto Q entrante, el conjunto de retenido después de UF1, el conjunto retenido después de DF, y el grueso final recuperado. Estos datos se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9.

| Conjunto | Resultados de SEC (% de monómeros) |
|--------------|------------------------------------|
| Conjunto Q | 99,8 |
| Final de UF1 | 99,8 |
| Final de DF | 99,8 |
| Grueso Final | 99,8 |

Ejemplo 4

5 **Formulación de alta concentración de rhuMAb E26 para la comparación-evaluación toxicológica de 10 kD y 30 kD** El ejemplo 3 se repitió con las siguientes excepciones. Se usaron dos sistemas UF a escala piloto para concentrar/formular rhuMAb E26. Se ensamblaron dos sistemas de Ultrafiltración/Diafiltración de Millipore Pelicon con una membrana compuesta de celulosa regenerada de 1,06 metros cuadrados, una con un tamaño de poro de 10.000 Daltons y la otra con un tamaño de poro de 30.000 Daltons. Las presiones del retenido se mantuvieron a
10 aproximadamente 41,37-62,05 kPa.

Proceso de 10 kD

15 Se midió que el conjunto de proteínas resultante de la etapa de cromatografía de Q-Sepharose anterior era de 5,85 g de E26/l y tuvo un volumen de 62,4 l. Durante la UF1, el conjunto se concentró hasta 50 g de E26/l (aproximadamente 7,3 l). Al final de la diafiltración, el conjunto se concentró adicionalmente en modo UF2 a una concentración final de 107,5 g de E26/l (3,4 l). La tabla 10 resume los resultados de rendimiento y flujo de UF1, DF y UF2.

20

Tabla 10.

| Fase del Proceso | Rendimiento Normalizado (g/m ² /h) | Flujo Normalizado (LMH/kPa) |
|------------------|---|-----------------------------|
| UF1 | 234,66 | 0,52 |
| DF | 171,15 | 0,38 |
| UF2 | 1.478,97 | 0,28 |

25 Para determinar la masa de las pérdidas durante la recuperación, se añadieron 987 ml de tampón DF al sistema y se recircularon durante aproximadamente 5 minutos y se recuperaron usando la misma secuencia descrita anteriormente. Este volumen se analizó después con respecto a la concentración de proteínas con los otros conjuntos. La tabla 11 resume los resultados.

Tabla 11.

| | Volumen (l) | Concentración (g/l) | Masa (g) | Rendimiento o {Pérdida} (%) |
|---------------------|-------------|---------------------|----------|-----------------------------|
| Conjunto Q | 62,4 | 5,85 | 365,4 | 100 |
| Conjunto recuperado | 3,38 | 107,5 | 361,7 | 98,9 |
| Tampón de lavado | 0,987 | 19,9 | 19,6 | 5,4 |
| Filtrado | 125 | n/d | n/d | n/d |

30 La FIG. 11 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para la velocidad de flujo de alimentación (210), temperatura del tanque (220), dP de alimentación (230), PTM (240) y velocidad de flujo del filtrado (250) a lo largo de las diversas fases o modos del proceso incluyendo UF1 (10), DF (20), UF2 (30) y dP bajo (40), para el proceso de 10 kDa.

35 La FIG. 12 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para la concentración (1210), flujo (1220) y PTM (1240) de E26 a lo largo de las diversas fases o modos del proceso incluyendo UF1 (10), DF (20), UF2 (30) y dP bajo (40), para el proceso de 10 kDa.

40 La FIG. 13 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para el descenso de presión frente a la concentración de proteínas observada para UF1 (1310) y UF2 (1320) para el proceso de 10 kDa.

Proceso de 30 kD

Se midió que el conjunto de proteínas resultante de la etapa de cromatografía en Q-Sepharose anterior era de 5,85 g de E26/l y tuvo un volumen de 64,5 l. Durante la UF1, el conjunto inicial se concentró hasta 50 g de E26/l (aproximadamente 7,5 l). Al final de la diafiltración, el conjunto se concentró adicionalmente en modo UF2 a una concentración final de 117,5 g de E26/l (3,2 l). La tabla 12 resume los resultados de rendimiento y flujo de UF1, DF y UF2.

Tabla 12.

| Fase del Proceso | Rendimiento Normalizado (g/m ² /h) | Flujo Normalizado (LMH/kPa) |
|------------------|---|-----------------------------|
| UF1 | 274,48 | 0,58 |
| DF | 189,44 | 0,35 |
| UF2 | 1.942,90 | 0,23 |

Para determinar la masa de las pérdidas durante la recuperación, se añadieron 918 ml de tampón DF al sistema y se recircularon durante aproximadamente 5 minutos y se recuperaron usando la misma secuencia descrita anteriormente. El conjunto recuperado se diluyó hasta 80 g de E26/l y se acondicionó en la formulación final de histidina 50 mM / trehalosa 150 mM / 0,02 % de polisorbato 20 / pH 6,0. La tabla 13 resume los resultados.

Tabla 13.

| | Volumen (l) | Concentración (g/l) | Masa (g) | Rendimiento o {Pérdida} (%) |
|---------------------|-------------|---------------------|----------|-----------------------------|
| Conjunto Q | 64,5 | 5,85 | 377,3 | 100 |
| Conjunto recuperado | 3,20 | 117,5 | 376,0 | 99,6 |
| Tampón de lavado | 0,918 | 22,7 | 20,8 | 5,5 |
| Filtrado | 125 | n/d | n/d | n/d |

La FIG. 14 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para la velocidad de flujo de alimentación (210), temperatura del tanque (220), dP de alimentación (230), PTM (240) y velocidad de flujo del filtrado (250) a lo largo de las diversas fases o modos del proceso incluyendo UF1 (10), DF (20), UF2 (30) y dP bajo (40), para el proceso de 30 kD.

La FIG. 15 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para la concentración (1510), flujo (1520) y PTM (1540) de E26 a lo largo de las diversas fases o modos del proceso incluyendo UF1 (10), DF (20), UF2 (30) y dP bajo (40), para el proceso de 30 kD.

La FIG. 16 muestra los valores del proceso observados o medidos a lo largo del tiempo para el descenso de presión frente a la concentración de proteínas observada para UF1 (1610) y UF2 (1620) para el proceso de 30 kD.

Ejemplo 5

Cambio de escala de rhuMAb E25 líquido El Ejemplo 1 se repitió con las siguientes excepciones.

Se usó un sistema UF a escala de producción para concentrar/formular un rhuMAb E25 líquido (un anticuerpo monoclonal recombinante humano que se dirige a IgE). El producto se puede usar en la aplicación terapéutica y ensayos de bioequivalencia en seres humanos. Los sistemas de Ultrafiltración/Diafiltración de Millipore Pelicon se ensamblaron con una membrana compuesta de celulosa regenerada de 20,99 metros cuadrados, con un tamaño de poro de 30.000 Daltons. Cada sistema consistía en un soporte de membrana, una bomba de alimentación de lóbulos rotatorios Viking S3S, tuberías de recirculación de acero inoxidable 316L de 3,83 cm y un recipiente de recirculación de 250 l.

Se usó un tanque recubierto de acero inoxidable 316L de 250 litros para el recipiente de recirculación. El control de temperatura para este tanque se alcanzó con una alimentación de temperatura modulada de glicol en el recubrimiento del tanque. La temperatura de la alimentación de glicol al recubrimiento del tanque se aumentó o disminuyó usando bien un intercambiador de calor de alimentación de vapor o un suministro de glicol frío respectivamente.

Para esta ejecución, la velocidad de flujo de alimentación se estableció a una velocidad constante de 114 l/min (0,5 l/min/h). El tampón de diafiltración (histidina 20 mM / cloruro de arginina 200 mM / pH 6,0) se preparó en un tanque separado. La temperatura de este tampón se estableció a 45 °C antes del proceso. Esto permitió un control

de la temperatura preciso a lo largo del proceso.

Antes del procesamiento, la solución de almacenamiento del sistema (NaOH 0,1 N) se lavó en un solo pase hasta un modo de drenaje primero con 10,76 l/m² de agua para inyección (WFI) y después con 10,76 l/m² de tampón de diafiltración. Después de los lavados, el sistema se equilibró recirculando 5,38 l/m² de tampón de diafiltración durante 10 min. El pH de la solución recirculada se comprobó para confirmar el equilibrio.

El conjunto de proteínas resultante de la etapa de cromatografía de Q-Sepharose anterior se midió para ser de 5,2562 g de E25/l y tuvo un volumen de 1.141 l. La proteína estaba en una solución de tampón TRIS 25 mM y NaCl a aproximadamente 200 mM y el pH se ajustó a 6,2. Inmediatamente antes de la ejecución, el punto de referencia de la temperatura de este conjunto se estableció a 45 °C. Para comenzar la ejecución el conjunto de proteínas se transfirió al recipiente de recirculación, a través de un filtro para uso en esterilización de 0,22 micrómetros a un nivel de aproximadamente 200 l en el tanque. En el recipiente el conjunto se agitó por medio de una pala montada en la parte superior y la temperatura se mantuvo a aproximadamente (40-50 °C). Debido a que el conjunto entrante fue mayor que el recipiente de recirculación, el proceso UF1 comenzó en modo semi-continuo. En este modo, el conjunto Q se añadió al recipiente de recirculación aproximadamente a la misma velocidad a la que el filtrado pasa a través de la membrana FFT hasta el drenaje. Después de que el conjunto Q restante se transfiriera al recipiente de recirculación, el proceso UF2 continuó en modo discontinuo. Durante el modo UF1 el conjunto se concentró a aproximadamente 30 g de E25/l (aproximadamente 200 l). Después el conjunto se diafiltró con aproximadamente 8 diavolumenes de tampón de diafiltración. Durante la diafiltración la temperatura se mantuvo entre 40 y 50 °C. La diafiltración se realizó a un volumen constante, que se alcanzó haciendo coincidir la velocidad de flujo del tampón que se transfería al tanque de recirculación con la velocidad del flujo del filtrado que se eliminaba del sistema. Al final de la diafiltración, el conjunto se concentró adicionalmente en modo UF2 hasta un punto referencia de la concentración final de >170 g de E25/l (35 l). Esta fase en modo UF2 también se realizó a un punto de referencia de la temperatura elevado de 45 °C+/-5 °C. A continuación, se realizó una mezcla con bajo descenso de presión en la que la bomba de alimentación se controló para mantener un descenso de presión de 34,47-68,95 kPa a lo largo del canal de alimentación. Se retiró una muestra y se realizó una exploración espectrofotométrica para confirmar la concentración antes de la recuperación. La concentración de esta muestra fue de 219 g de E25/l. La tabla 14 resume los resultados de rendimiento y flujo medidos durante las fases UF1, DF (DF1+DF2) y UF2.

Tabla 14.

| Fase del Proceso | Rendimiento Normalizado (g/m ² /h) | Flujo Normalizado (LMH/kPa) |
|------------------|---|-----------------------------|
| UF1 | 471,46 | 0,48 |
| DF | 278,78 | 0,36 |
| UF2 | 849,27 | 0,09 |

Inmediatamente antes de la recuperación del producto, se retiró una muestra de 30 ml y se envió para la detección y título de la carga biológica. El resultado fue de <0,13 UFC/ml. El conjunto de proteínas se recuperó por una serie de etapas. Primero, el producto se desplazó de la membrana en un modo de un solo pase usando 5 l de tampón DF añadidos a la línea de retención. El producto se filtró en un tanque de recuperación a través de un filtro protector para uso en esterilización de 0,22 micrómetros de 0,69 m² seguido de un filtro final para uso en esterilización de 0,22 micrómetros de 0,19 m². El conjunto del tanque de recirculación se bombeó después del tanque usando la bomba de alimentación de lóbulos rotatorios. A continuación la solución de proteínas residual se desplazó del tanque y de la línea de alimentación con una purga de nitrógeno gaseoso a 24,47 kPa. La fase final fue una purga de la unidad de membrana, que ahora contenía mayoritariamente tampón DF del desplazamiento del producto inicial. Esta fase también usó 34,47 kPa de nitrógeno gaseoso aplicados al punto más alto de la línea de retención. El conjunto recuperado se diluyó primero hasta aproximadamente 153 g de E25/l usando tampón DF. Finalmente, el conjunto se acondicionó en la formulación final de histidina 20 mM / arginina-HCl 200 mM / 0,04 % de polisorbato 20 / pH 6,0. Cada uno de los volúmenes del conjunto recuperado, conjunto diluido y conjunto acondicionado (conjunto Q) se analizó después con respecto a la concentración de proteínas. La Tabla 15 resume los resultados.

Tabla 15.

| | Volumen (l) | Concentración (g/l) | Masa (g) | Rendimiento o {Pérdida} (%) |
|---------------------|-------------|---------------------|----------|-----------------------------|
| Conjunto Q | 1.141 | 5,2562 | 5.997,3 | 100 |
| Conjunto Recuperado | 35,0 | 170,0 | 5.950,0 | 99,2 |
| Conjunto Diluido | 39,0 | 147,0 | 5.726 | 95,5 |

La FIG. 17 muestra los parámetros de velocidad de flujo de alimentación (210), temperatura del tanque (220), dP de alimentación (230), PTM (240) y velocidad de flujo del filtrado (250) durante las diversas fases o modos del proceso incluyendo UF1 (10), DF1 (20), DF2 (25), UF2 (30) y dP bajo (50).

Ejemplo 6

Preparación de rhuMAb E25 líquido El Ejemplo 5 se repitió con las siguientes excepciones. Se usó un sistema UF a escala para concentrar/formular el rhuMAb E25 líquido (E25, un anticuerpo monoclonal humano recombinante que se dirige a IgE). Los sistemas de Ultrafiltración/Diafiltración de Millipore Pelicon se ensamblaron con una membrana compuesta de celulosa regenerada de 20,99 metros cuadrados, con un tamaño de poro de 30.000 Daltons. Cada sistema consistió en un soporte de membrana, una bomba de alimentación de lóbulos rotatorios Viking S3S, tuberías de recirculación de acero inoxidable 316L de 3,81 cm, y un recipiente de recirculación de 230 l. Se usó un tanque recubierto de acero inoxidable 316L de 250 litros para el recipiente de recirculación. La velocidad de flujo de alimentación se estableció a una velocidad constante de 114 l/min (5,38 l/min/m²). Durante todas las operaciones antes al uso y después del uso el control de la presión de retenido se estableció a una constante de 68,95 kPa. Durante las operaciones de ultrafiltración y diafiltración el sistema usó el esquema de control C_{wall} para controlar el flujo a través de la membrana. El tampón de diafiltración (Histidina 20 mM / cloruro de arginina 200 mM / pH 6,0) se preparó en un tanque separado. La temperatura de este tampón se estableció a 45 °C antes del proceso. Esto permitió un control de la temperatura preciso a través del proceso completo. Se midió que el conjunto de proteínas resultante de la fase de cromatografía de Q-Sepharose anterior era de 5,5438 g de E25/l y tuvo un volumen de 1.082 l. La proteína estaba en una solución de tampón TRIS 25 mM y NaCl aproximadamente 200 mM y el pH se ajustó a 6,2. Inmediatamente antes de la ejecución, el punto de referencia de la temperatura de este conjunto se estableció a 45 °C. Para comenzar la ejecución el conjunto de proteínas se transfirió al recipiente de recirculación, a través de un filtro para uso en esterilización de 0,22 micrómetros a un nivel de aproximadamente 200 l en el tanque. En el recipiente el conjunto se agitó por medio de una pala montada en la parte superior y se mantuvo a temperatura ambiente (40-50 °C). Debido a que el conjunto entrante fue mayor que el recipiente de recirculación, el proceso UF1 comenzó en modo semi-continuo. En este modo, el conjunto Q se añadió al recipiente de recirculación a aproximadamente la misma velocidad a la que el filtrado pasa a través de la membrana FFT hasta el drenaje. Después de que el conjunto Q restante se transfiriera al recipiente de recirculación, continuó el proceso UF1 en modo discontinuo. Durante la UF1 el conjunto se concentró hasta aproximadamente 30 g de E25/l (aproximadamente 200 l). El conjunto se diafiltró después con 8 diavolumenes de tampón de diafiltración. Durante la diafiltración la temperatura se mantuvo entre 40 y 50 °C. La diafiltración se realizó a un volumen constante, que se alcanzó haciendo coincidir la velocidad de flujo del tampón que se transfería al tanque de recirculación con la velocidad de flujo del filtrado que se eliminaba del sistema. Al final de la diafiltración, el conjunto se concentró adicionalmente en modo UF2 hasta un punto de referencia de la concentración final de más de 170 g de E25/l (35 l). Esta fase también se realizó a un punto de referencia de la temperatura elevado de 45 °C \pm 5 °C. A continuación, se realizó una mezcla con bajo descenso de presión en la que la bomba de alimentación se controló para mantener el descenso de la presión en 34,47-68,58 kPa a lo largo del canal de alimentación. Se retiró una muestra y se realizó una exploración espectrofotométrica para confirmar la concentración antes de la recuperación. La concentración de esta muestra fue de 191 g de E25/l y el volumen de conjunto fue de 31,9 l. Una gráfica de los parámetros del proceso a lo largo del tiempo fue comparable a los observados y resumidos para la FIG. 17 anterior.

Tabla 14.

| Fase del Proceso | Rendimiento Normalizado (g/m ² /h) | Flujo Normalizado (LMH/kPa) |
|------------------|---|-----------------------------|
| UF1 | 485,46 | 0,46 |
| DF | 278,79 | 0,36 |
| UF2 | 1.306,74 | 0,11 |

Inmediatamente antes de la recuperación del producto, se retiró una muestra de 30 ml y se analizó con respecto a un título de la carga biológica. Los resultados de este ensayo estuvieron por debajo del límite de detección (<0,13 UFC/ml). El conjunto de proteínas se recuperó por una serie de etapas. Primero el producto se desplazó de la membrana en un modo de un solo pase usando 5 l de tampón DF añadidos a la línea de retención. El producto se filtró en un tanque de recuperación a través de un filtro protector para uso en esterilización de 0,22 micrómetros y 0,69 m² seguido de un filtro final para uso en esterilización de 0,22 micrómetros y 0,19 m². El conjunto del tanque de recirculación se bombeó después del tanque usando la bomba de alimentación de lóbulos rotatorios. A continuación, la solución residual de proteínas se desplazó del tanque y de la línea de alimentación con una purga de nitrógeno gaseoso a 34,47 kPa. La fase final fue una purga de la unidad de membrana, que contenía mayoritariamente tampón DF del desplazamiento del producto inicial. Esta fase también usó 34,47 kPa de nitrógeno gaseoso aplicados al punto más alto de la línea de retención. El conjunto recuperado se diluyó primero hasta aproximadamente 153 g de E25/l usando tampón DF. Finalmente, el conjunto se acondicionó en la formulación final de histidina 20 mM / arginina-HCl 200 mM / 0,04 % de polisorbato 20 / pH 6,0. Los volúmenes del conjunto recuperado, conjunto diluido y conjunto acondicionado se analizaron después para la concentración de proteínas. La Tabla 15 resume los resultados. Después del proceso la membrana se regeneró tal como se ha descrito anteriormente.

Tabla 15.

| | Volumen (l) | Concentración (g/l) | Masa (g) | Rendimiento o {Pérdida} (%) |
|----------------------------|-------------|---------------------|----------|-----------------------------|
| Conjunto Q | 1.082 | 5,5438 | 5.998,4 | 100 |
| Conjunto Recuperado | 34,95 | 167,08 | 5.839,8 | 97,4 |
| Conjunto Diluido | 38,2 | 152,14 | 5.810,3 | 96,7 |

Ejemplo 7

5 **Efecto de la temperatura elevada en la calidad de producto** Las muestras de E25 a 30 g/l y 150 g/l en tampones de histidina y Q se mantuvieron a diversas temperaturas durante 24 horas. Se tomaron muestras para la medición de la turbidez y los ensayos SEC. Los resultados de la turbidez frente a la temperatura para E25 a 30 g/l en tampón Q se muestran en la FIG. 18. La FIG. 19 muestra la cantidad de agregado soluble de E25 (150 g/l en tampón de histidina 50 mM, pH 6,0) observada a lo largo del tiempo y a una temperatura de 23 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C. 10 Los cuatro intervalos de tiempo (tiempo de 0 horas, 4 horas, 7,5 horas y 24 horas) para cada una de estas temperaturas se muestran en el grupo de cuatro barras de izquierda a derecha como 1810 y 1910, en las FIG 18 y 19. La turbidez de la solución fue esencialmente invariable después de 24 horas a 60 °C. No se observaron agregados solubles significativos de E25 por debajo de los 70 °C lo que sugirió que las muestras de producto eran 15 sustancialmente estables hasta al menos 60 °C y al menos 24 horas.

Ejemplo 8

Efecto de la temperatura elevada en la carga biológica Las muestras de E25 a 30 g/l tanto en tampón de arginina como histidina se inocularon con 10^3 unidades formadoras de colonias por ml para dos organismos estimulados: una 20 cepa Gram positiva (*Staphylococcus aureus*); y una cepa Gram negativa (*Pseudomonas chlororaphis*). Las muestras se tomaron después de 1,5 horas y 6 horas. Los resultados mostrados en los gráficos de barras de las FIG. 20 y 21 indican que la estimulación de ambos de estos organismos disminuyó con el aumento de la temperatura. Los tres intervalos de temperatura (temperaturas de 25 °C, 40 °C y 50 °C horas) para cada intervalo de tiempo observado se muestran en los grupos de tres barras de izquierda a derecha como 2010 y 2110, en las FIG. 20 y 21. Los inóculos 25 mostrados se llevaron a cabo en tampón de arginina con concentraciones de proteínas de 30 g/l.

Ejemplo 9

Efecto de la temperatura elevada en el flujo del proceso Las muestras de E25 a 10 g/l en tampón de arginina 30 0,2 M, histidina 25 mM, pH 6,0 se evaluaron con respecto a su influencia en el flujo frente a la presión transmembrana (PTM). La FIG. 22 muestra que el aumento de la temperatura del sistema también aumentó el flujo del proceso durante las operaciones UF/DF. Se realizaron excursiones de flujo a diversas concentraciones de los gruesos y a tres temperaturas distintas de 23 °C (2210), 40 °C (2220) y 46 °C (2230). El coeficiente de transferencia de masa y el flujo del filtrado aumentó de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 veces proporcionando tiempos 35 de proceso considerablemente reducidos.

Ejemplo 10

Formulación de alta concentración de rhuMAB anti CD20 ("2H7") Se usó un sistema UF a escala piloto para 40 concentrar y formular el rhuMab anti-CD20 (2H7; un anticuerpo monoclonal humano recombinante). El ejemplo 1 se repitió con las siguientes excepciones. Los sistemas de Ultrafiltración/Diafiltración de Millipore Pelicon se ensamblaron con una membrana compuesta de celulosa regenerada de 1,63 metros cuadrados, con un tamaño de poro de 30.000 Daltons. El sistema consistió en un soporte de membrana, una bomba de alimentación de lóbulos rotarios Viking S1 L, tuberías de recirculación de acero inoxidable 316L de 1,27 cm, y un recipiente de recirculación 45 de 40 l. Las válvulas que regulaban la contrapresión fueron de H.D. Baumann, Inc. La temperatura del glicol aportado al recubrimiento del tanque se reguló positiva o negativamente según fue necesario usando un intercambiador de calor eléctrico, una fuente de glicol frío, o ambas.

50 Durante esta ejecución, la velocidad de flujo de alimentación se estableció a una velocidad constante de 8,5 l/min (aproximadamente $5,38 \text{ l/min/m}^2$). La FIG. 23 muestra las tendencias de los valores a lo largo del tiempo para la velocidad de flujo de alimentación (210) en una escala de 0 a 20, pH (212) en una escala de 2 a 12, velocidad de flujo del filtrado (250) en una escala de 0 a 5, nivel del tanque de reciclado (2320) en una escala de 0 a 45, y dP del retenido (2350) en una escala de 0 a 100 durante las diversas fases o modos del proceso incluyendo UF1 (10), DF1 (20) y UF2 (30).

55 Durante las operaciones de ultrafiltración y diafiltración el sistema usó una presión constante del retenido seguida de un esquema de control de presión de alimentación/retenido constante delta para controlar el flujo a través de la membrana. El tampón de diafiltración (acetato de sodio 30 Mm/pH 4,9) se preparó en un tanque separado. La temperatura de este tampón se estableció a 45 °C antes del proceso para un control de la temperatura preciso a lo

largo del proceso completo. Antes del procesamiento, la solución de almacenamiento del sistema (NaOH 0,1 N) se lavó en un solo pase hasta el modo de drenaje primero con 10,764 l/m² de agua para inyección (WFI) y después con 10,764 l/m² de tampón de diafiltración. Después de los lavados el sistema se equilibró recirculando 5,38 l/m² de tampón de diafiltración durante 10 minutos. El pH de la solución recirculada se comprobó para confirmar el equilibrio.

Se midió que el conjunto de proteínas resultante de la etapa de cromatografía de Q-Sepharose anterior era de 2,31 g de 2H7/l y tuvo un volumen de 356 l. La proteína estaba en una solución de tampón HEPES 6 mM sin ácido/ solución salina de HEPES 19 mM y acetato de sodio 25 mM que tenía un pH ajustado a 5,3 con ácido acético 0,5 M. Inmediatamente antes de la ejecución, el punto de referencia de la temperatura de este conjunto se estableció a 45 °C. Para comenzar la ejecución el conjunto de proteínas se transfirió al recipiente de recirculación a través de un filtro para uso en esterilización de 0,22 micrómetros a un nivel de aproximadamente 40 l en el tanque. En el recipiente el conjunto se agitó por medio de una pala montada en la parte superior y la temperatura se mantuvo a 40-50 °C.

Debido a que el conjunto entrante fue mayor que el recipiente de recirculación, el proceso UF1 comenzó en modo semi-continuo (véase FIG. 23). En este modo, el conjunto Q se añadió al recipiente de recirculación a aproximadamente la misma velocidad que el filtrado pasa a través de la membrana FFT hasta el drenaje. Después de que el conjunto Q restante se transfiriera al recipiente de recirculación, el proceso UF1 continuó en modo discontinuo. Durante la UF1 el conjunto se concentró hasta aproximadamente 50 g 2H7/l (aproximadamente 16 l). Después el conjunto se diafiltró con 10 diavolumenes de tampón de diafiltración. Durante la diafiltración la temperatura se mantuvo entre 40 y 50 °C. La diafiltración se llevó a cabo a un volumen constante, que se alcanzó haciendo coincidir la velocidad de flujo del tampón que se transfería al tanque de recirculación con la velocidad de flujo del filtrado que se eliminaba del sistema. Al final de la diafiltración, el conjunto se concentró adicionalmente en modo UF2 hasta un punto de referencia de una concentración final objetivo de 190 g de 2H7/l (4,3 l). Véase en la FIG. 23 la incorporación del control de dP constante a 344,74 kPa al final de esta fase. Esta fase también se realizó a un punto de referencia de temperatura elevado de 45 °C+/-5 °C. A continuación, se realizó una mezcla con bajo descenso de presión en la que la bomba de alimentación se controló para mantener un descenso de presión de 137,9 kPa a lo largo del canal de alimentación. Se retiró una muestra y se realizó una medición de la densidad para confirmar la concentración antes de la recuperación. La concentración de esta muestra fue de 189 g de 2H7/l. La tabla 16 resume los resultados de rendimiento y flujo.

Tabla 16.

| Fase del Proceso | Rendimiento Normalizado (g/m ² /h) | Flujo Normalizado (LMH/kPa) |
|------------------|---|-----------------------------|
| UF1 | 344,45 | 0,69 |
| DF | 602,78 | 0,34 |
| UF2 | 2.873,99 | 0,23 |

El conjunto de proteínas se recuperó por una serie de etapas. Primero el producto se desplazó de la membrana en un modo de un solo paso usando 0,2 l de tampón DF añadidos a la línea de retención. El producto se filtró en un tanque de recuperación a través de un filtro final para uso en esterilización de 0,22 micrómetros. El conjunto del tanque de recirculación se bombeó después del tanque usando una bomba de alimentación de lóbulos rotatorios. A continuación, la solución de proteínas residual se desplazó del tanque y de la línea de alimentación con una purga de nitrógeno gaseoso a 34,47 kPa. La fase final fue una purga de la unidad de membrana, que ahora contenía tampón DF del desplazamiento del producto inicial. Esta fase también usó nitrógeno gaseoso a 34,47 kPa aplicado al punto más alto de la línea de retención.

Cuando fue necesario, el conjunto recuperado se diluyó primero hasta aproximadamente 175 g de 2H7/l usando tampón de dilución (acetato de sodio 30 mM, pH 5,3). Finalmente, el conjunto se diluyó hasta una concentración objetivo de 150 g de 2H7/l y se acondicionó en la formulación final de acetato de sodio 30 mM, trehalosa al 7 %, 0,03 % de polisorbato 20, pH 5, por medio de un tampón de acondicionamiento 7 X (acetato de sodio 30 mM), trehalosa al 49 %, y 0,21 % de polisorbato 20, pH 5,3).

Los volúmenes del conjunto recuperado, conjunto diluido y conjunto acondicionado se analizaron después para la concentración de proteínas. La Tabla 17 presenta los resultados.

Tabla 17.

| | Volumen (l) | Concentración (g/l) | Masa (g) | Rendimiento o {Pérdida} (%) |
|---------------------|-------------|---------------------|----------|-----------------------------|
| Conjunto Q | 355,81 | 2,31 | 821,92 | 100,0 |
| Conjunto Recuperado | 4,64 | 180,02 | 835,3 | 101,6 |
| Conjunto Diluido | 4,871 | 149,40 | 727,7 | 88,5 |

Nota: el rendimiento incluye la pérdida debida al muestreo. El volumen y la concentración del conjunto recuperado incluyen la adición del tampón de desplazamiento.

Después del proceso, la membrana se regeneró usando NaOH 0,1 N, con un lavado de un solo pase de 10,764 l/m² seguido de la recirculación total de 5,38 l/m² durante 30 min. A esto le siguió un lavado de 10,764 l/m² con AP. A esto le siguió una recirculación total de 5,38 l/m² de solución Minncare al 1,4 % durante 30 min. El sistema de lavó de nuevo con 10,764 l/m² de AP y finalmente se recirculó durante 15 min con NaOH 0,1 N y se almacenó.

Ejemplo 11

Formulación de alta concentración de rhuMAB anti CD20 Se usó un sistema UF a escala piloto para concentrar y formular el rhuMab antiCD20 (2H7) para el uso en un estudio clínico en fase I en seres humanos en unas instalaciones de fabricación GMP. El ejemplo 10 se repitió con las siguientes excepciones.

Se midió que el conjunto de proteínas resultante de una etapa de cromatografía de Q-Sepharose anterior era de 3,729 g de 2H7/l y tuvo un volumen de 262 l. La proteína estaba en una solución de ácido libre HEPES 6 mM / sal sódica de HEPES 19 mM y acetato de sodio 25 mM que tenían un pH ajustado a 5,3 con ácido acético 0,5 M. Inmediatamente antes de la ejecución, el punto de referencia de la temperatura de este conjunto se estableció a 45 °C. Para comenzar la ejecución el conjunto de proteínas se transfirió al recipiente de recirculación a través de un filtro para uso en esterilización de 0,22 micrómetros a un nivel de aproximadamente 40 l en el tanque. En el recipiente el conjunto se agitó por medio de una pala montada en la parte superior y la temperatura se mantuvo a 40-50 °C.

Durante la UF1 el conjunto se concentró hasta aproximadamente 50 g de 2H7/L (aproximadamente 20 l). La FIG. 24 muestra las tendencias de los valores a lo largo del tiempo para el nivel del tanque de reciclado (210) en una escala de -0,713963 a 295,989, dP del retenido (2420) en una escala de -0,237899 a 98,6629, velocidad del flujo de alimentación (250) en una escala de -0,356981 a 147,994, y velocidad de flujo del filtrado (2450) en una escala de -0,118994 a 49,3315 durante el proceso. El conjunto se diafiltró después con 10 diavolumenes de tampón de diafiltración. Durante la diafiltración la temperatura se mantuvo entre 40 y 50 °C. La diafiltración se realizó a un volumen constante, que se alcanzó haciendo coincidir la velocidad de flujo del tampón que se transfería al tanque de recirculación con la velocidad del flujo del filtrado que se eliminaba del sistema. Al final de la diafiltración, el conjunto se concentró adicionalmente en modo UF2 hasta un punto de referencia objetivo de la concentración final de 190 g de 2H7/l (5,25 l). Obsérvese en la FIG. 24 la incorporación del control del dP constante a 275,79 kPa al final de esta fase. Esta fase también se realizó a un punto de referencia de temperatura elevado de 45 °C+/-5 °C. A continuación, se realizó una mezcla con bajo descenso de presión en la que la bomba de alimentación se controló para mantener un descenso de presión de 137,9 kPa a lo largo del canal de alimentación. Se retiró una muestra y se realizó una medición de la densidad para confirmar la concentración antes de la recuperación. La concentración de esta muestra fue de 194 g de 2H7/l. La tabla 18 resume los resultados de rendimiento y flujo.

Tabla 18.

| Fase del Proceso | Rendimiento Normalizado (g/m ² /h) | Flujo Normalizado (LMH/kPa) |
|------------------|---|-----------------------------|
| UF1 | 548,96 | 0,55 |
| DF | 495,14 | 0,31 |
| UF2 | 3.078,50 | 0,23 |

Inmediatamente antes de la recuperación del producto, se retiró una muestra de 30 ml y se envió para la detección y el título de la carga biológica. Los resultados fueron negativos (es decir, <0,13 UFC/ml). El conjunto de proteínas se recuperó por la serie de etapas del Ejemplo 10. Los volúmenes del conjunto recuperado, conjunto diluido, y conjunto acondicionado se analizaron después con respecto a la concentración de proteínas. La Tabla 19 representa los resultados. La membrana se regeneró como en el Ejemplo 10.

Tabla 19.

| | Volumen (l) | Concentración (g/l) | Masa (g) | Rendimiento o {Pérdida} (%) |
|---------------------|-------------|---------------------|----------|-----------------------------|
| Conjunto Q | 262 | 3,72 | 977 | 100 |
| Conjunto Recuperado | 5,0 | 174,0 | 863,0 | 88,3 |
| Conjunto Diluido | 5,421 | 149,6 | 811,0 | 83,0 |

Ejemplo 12

Formulación de alta concentración de rhuMAB anti-CD20 GMP El ejemplo 11 se repitió con las siguientes excepciones. Se midió que el conjunto de proteínas resultante de una etapa de cromatografía de Q-Sepharose anterior era de 5,106 mg de 2H7/l y tuvo un volumen de 196 l. La proteína estaba en una solución de ácido libre HEPES 6 mM / sal sódica de HEPES 19 mM y acetato de sodio 25 mM que tenían un pH ajustado a 5,3 con ácido acético 0,5 M. Inmediatamente antes de la ejecución, el punto de referencia de la temperatura de este conjunto se estableció a 45 °C. Para comenzar la ejecución el conjunto de proteínas se transfirió al recipiente de recirculación a través de un filtro para uso en esterilización de 0,22 micrómetros a un nivel de aproximadamente 40 l en el tanque. En el recipiente se agitó el conjunto por medio de una pala montada en la parte superior y la temperatura se mantuvo a 40-50 °C.

Durante la UF1 el conjunto se concentró hasta aproximadamente 50 g de 2H7/L (aproximadamente 20 l). La FIG. 25 muestra las tendencias de los valores a lo largo del tiempo para el nivel del tanque de reciclado (210) en una escala de 0 a 300, dP del retenido (2520) en una escala de 0 a 100, velocidad del flujo de alimentación (250) en una escala de 0 a 150, y velocidad de flujo de filtrado (2550) en una escala de 0 a 50 durante el proceso. El conjunto se diafiltró con 10 diavolumenes (10 X) de tampón de diafiltración. Durante la diafiltración la temperatura se mantuvo entre 40 y 50 °C. La diafiltración se realizó a un volumen constante, que se alcanzó haciendo coincidir la velocidad de flujo del tampón que se transfería al tanque de recirculación con la velocidad de flujo del filtrado que se eliminaba del sistema. Al final de la diafiltración, el conjunto se concentró adicionalmente en modo UF2 a un punto de referencia de concentración final objetivo de 190 g de 2H7/l (5,26 l) nuevamente utilizando un control de dP constante muy al final de esta fase (véase la FIG. 25). Esta fase también se realizó a un punto de referencia de la temperatura elevado de 45 °C+/-5 °C. A continuación, se realizó una mezcla con bajo descenso de presión en la que la bomba de alimentación se controló para mantener un descenso de presión de 137,9 kPa a lo largo del canal de alimentación. Se retiró una muestra y se realizó una medición de la densidad para confirmar la concentración antes de la recuperación. La concentración de esta muestra fue de 191 g de 2H7/l. La tabla 20 resume los resultados de rendimiento y flujo.

Tabla 20.

| Fase del Proceso | Rendimiento Normalizado (g/m ² /h) | Flujo Normalizado (LMH/kPa) |
|------------------|---|-----------------------------|
| UF1 | 721,19 | 0,52 |
| DF | 505,91 | 0,30 |
| UF2 | 3.143,09 | 0,26 |

Inmediatamente antes de la recuperación del producto, se retiró una muestra de 30 ml y se envió para la detección y título de la carga biológica. Los resultados fueron negativos (es decir, <0,13 UFC/ml). El conjunto de proteínas se recuperó por una serie de etapas como en el Ejemplo 11. Los volúmenes del conjunto recuperado, conjunto diluido, y conjunto acondicionado se analizaron después con respecto a la concentración de proteínas. La Tabla 21 representa los resultados. La membrana se regeneró como en el Ejemplo 10.

Tabla 21.

| | Volumen (l) | Concentración (g/l) | Masa (g) | Rendimiento o {Pérdida} (%) |
|---------------------|-------------|---------------------|----------|-----------------------------|
| Conjunto Q | 196 | 5,106 | 1000 | 100 |
| Conjunto Recuperado | 4,9 | 187,1 | 918,0 | 91,8 |
| Conjunto Diluido | 6,075 | 150,9 | 916,9 | 91,7 |

La divulgación se ha descrito con referencia a diversas realizaciones y técnicas específicas y preferidas.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar composiciones de anticuerpos altamente concentradas, que comprende:

- 5 a) una primera ultrafiltración de una primera preparación de anticuerpos para proporcionar una segunda preparación de anticuerpos que comprende el retenido de la primera ultrafiltración;
- b) una diafiltración de la segunda preparación de anticuerpos para proporcionar una preparación de anticuerpos diafiltrada intermedia que comprende el retenido de la diafiltración; y
- 10 c) una segunda ultrafiltración de la preparación de anticuerpos diafiltrada intermedia para proporcionar una tercera preparación de anticuerpos que comprende el retenido de la segunda ultrafiltración;

en el que una o más de las etapas a), b) y c), se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C.

15 2. El proceso de la reivindicación 1, en el que una o más de las etapas a), b) y c) se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C.

3. El proceso de la reivindicación 2, en el que las etapas a), b) y c) se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C.

20 4. El proceso de la reivindicación 1, en el que una o más de las etapas a), b) y c) se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 50 °C.

5. El proceso de la reivindicación 4, en el que las etapas a), b) y c) se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 50 °C.

6. El proceso de la reivindicación 1, en el que una o más de las etapas a), b) y c) se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 45 °C.

30 7. El proceso de la reivindicación 1, en el que una o más de las etapas a), b) y c) se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C.

8. El proceso de la reivindicación 1, en el que una o más de las etapas a), b) y c) se llevan a cabo a una temperatura de 40 °C.

35 9. El proceso de la reivindicación 1, en el que una o más de las etapas a), b) y c) se llevan a cabo a una temperatura de 40 °C a 50 °C, o 45 °C ± 5 °C.

40 10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el proceso se lleva a cabo en:

- i. de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 horas;
- ii. de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 horas; o
- iii. aproximadamente 3 horas.

45 11. El proceso de la reivindicación 1, en el que la primera preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 g/l.

12. El proceso de la reivindicación 1, en el que la primera preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 g/l.

50 13. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la segunda preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 g/l.

14. El proceso de la reivindicación 13, en el que la segunda preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 g/l.

55 15. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la tercera preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 g/l.

60 16. El proceso de la reivindicación 15, en el que la tercera preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 100 a aproximadamente 230 g/l.

17. El proceso de la reivindicación 16, en el que la tercera preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 170 a aproximadamente 200 g/l.

65

- 5 18. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11, en el que la preparación de anticuerpos intermedia tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 g/l y la tercera preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 170 a aproximadamente 200 g/l.
- 10 19. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 10, en el que la primera ultrafiltración concentra la primera preparación de anticuerpos para proporcionar una segunda preparación de anticuerpos que tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 30 g/l y la segunda ultrafiltración concentra la preparación de anticuerpos intermedia para proporcionar la tercera preparación de anticuerpos que tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 170 a aproximadamente 200 g/l.
- 15 20. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el rendimiento de la tercera preparación de anticuerpos es mayor de aproximadamente el 70 % en peso basándose en el peso de los anticuerpos de la primera preparación de anticuerpos.
- 20 21. El proceso de la reivindicación 20, en el que el rendimiento de la tercera preparación de anticuerpos es de aproximadamente el 80 a aproximadamente el 100 % en peso basándose en el peso de los anticuerpos de la primera preparación de anticuerpos.
- 25 22. El proceso de la reivindicación 21, en el que el rendimiento de la tercera preparación de anticuerpos es mayor de aproximadamente el 98 % en peso basándose en el peso de anticuerpos de la primera preparación de anticuerpos.
23. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las etapas de filtración a), b) y c) utilizan una membrana de ultrafiltración.
- 30 24. El proceso de la reivindicación 23, en el que las etapas de filtración a), b) y c) se llevan a cabo por filtración de flujo tangencial a través de una membrana de ultrafiltración.
25. El proceso de la reivindicación 23 o de la reivindicación 24, en el que una membrana de ultrafiltración utilizada en la etapa de filtración a) se usa en la etapa b) y en la etapa c).
- 35 26. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 23-24, en el que la membrana de ultrafiltración usada en las etapas a) y c) comprende una membrana de ultrafiltración compuesta de celulosa regenerada.
- 40 27. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 23-24, en el que la membrana de ultrafiltración usada en las etapas a) y c) tiene un tamaño de poro nominal de aproximadamente 5 a 50 kiloDaltons.
28. El proceso de la reivindicación 1, en el que la membrana de ultrafiltración usada en las etapas a) y c) tiene un tamaño de poro nominal de aproximadamente 10 a 30 kiloDaltons.
- 45 29. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera preparación de anticuerpos comprende un anticuerpo que tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 100 a 200 kiloDaltons.
30. El proceso de la reivindicación 29, en el que la primera preparación de anticuerpos comprende un anticuerpo que tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kiloDaltons.
- 50 31. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la diafiltración intercambia un primer tampón por un segundo tampón.
- 55 32. El proceso de la reivindicación 31, en el que primer tampón comprende una mezcla acuosa de cloruro sódico y tampón TRIS, y el segundo tampón comprende una mezcla acuosa de cloruro de histidina y cloruro de arginina.
33. El proceso de la reivindicación 30 o de la reivindicación 31, en el que la etapa de diafiltración realiza un intercambio de tampón a volumen constante, concentración de anticuerpos constante, o ambas.
- 60 34. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la diafiltración lleva a cabo un intercambio de tampón desde aproximadamente 5 a 15 veces el volumen.
35. El proceso de la reivindicación 34, en el que la diafiltración lleva a cabo un intercambio de tampón de aproximadamente 8 veces el volumen.
- 65 36. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa b) comprende una o más etapas de diafiltración.

37. El proceso de la reivindicación 36, en el que una primera etapa de diafiltración lleva a cabo un intercambio de tampón de aproximadamente 4 veces el volumen y una segunda etapa de diafiltración lleva a cabo un intercambio de tampón de aproximadamente 4 veces el volumen.
- 5 38. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera ultrafiltración tiene una velocidad de recirculación de desde aproximadamente 5,38 l/min/m² a aproximadamente 53,82 l/min/m².
39. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la ultrafiltración y diafiltración se llevan a cabo a una presión transmembrana de desde aproximadamente 34,47 a aproximadamente 344,74 kPa.
- 10 40. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las etapas a), b) y c) se llevan a cabo a una presión transmembrana de aproximadamente 68,95 a aproximadamente 344,74 kPa.
- 15 41. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la tercera preparación de anticuerpos tiene una carga biológica detectable menor de aproximadamente 100 UFC/ml.
42. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-IgE.
- 20 43. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de contaminantes agregados en la tercera preparación de anticuerpos es menor del 5 por ciento en peso.
44. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de contaminantes agregados en la tercera preparación de anticuerpos es menor del 2 por ciento en peso.
- 25 45. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 30 46. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 44, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
47. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 44, en el que el anticuerpo es un diacuerpo, un anticuerpo lineal, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo multiespecífico.
- 35 48. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 44, en el que el anticuerpo es un fragmento de unión antigénica seleccionado del grupo que consiste en fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv.
- 40 49. El proceso de la reivindicación 45, en el que el anticuerpo es rhuMAbE25 anti-IgE o un fragmento de unión antigénica del mismo.

FIG.1

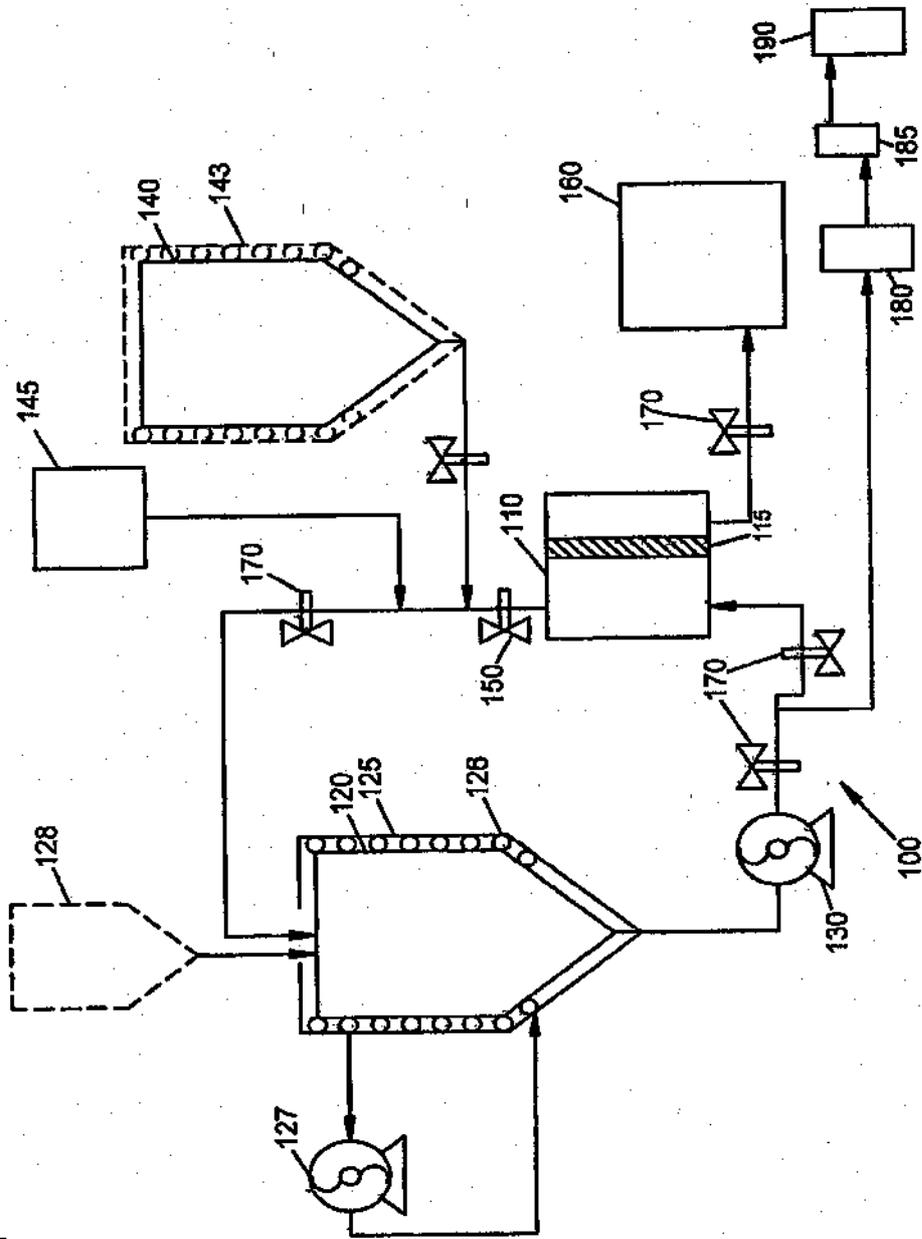


FIG.2

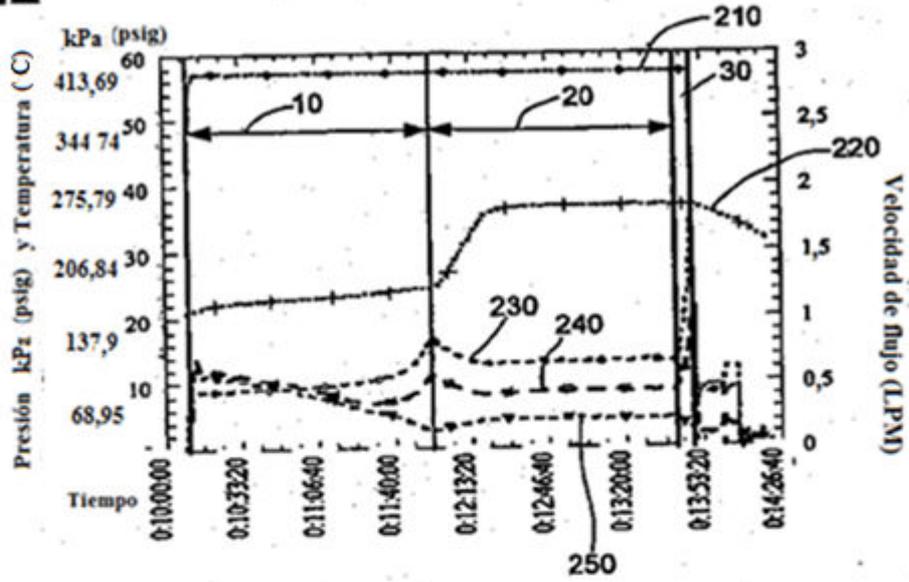
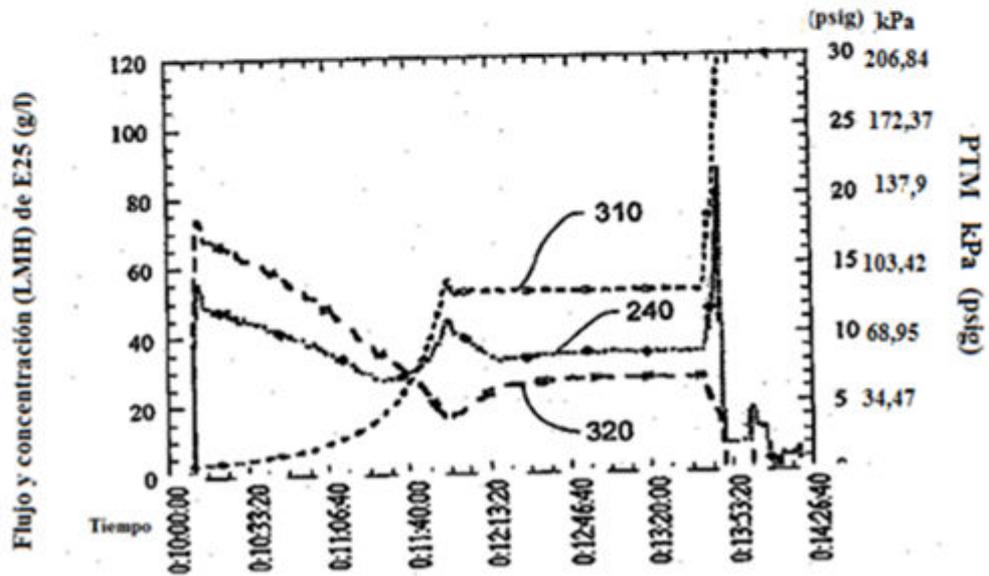


FIG.3



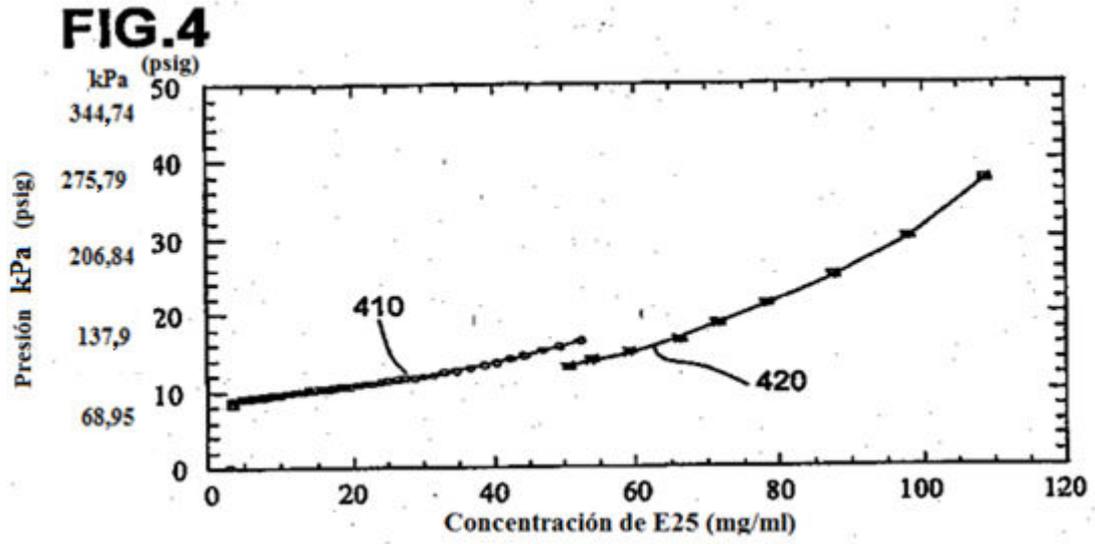


FIG.5

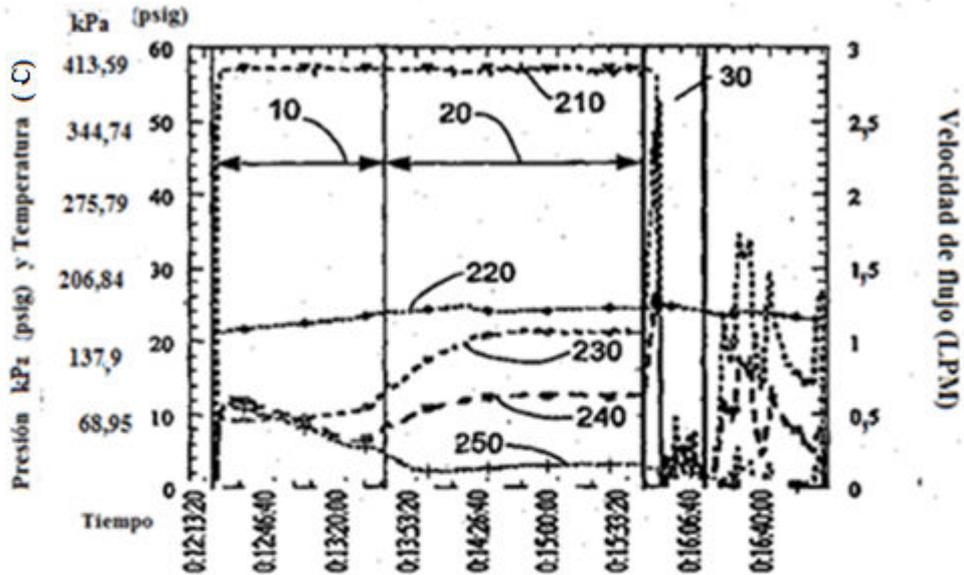


FIG.6

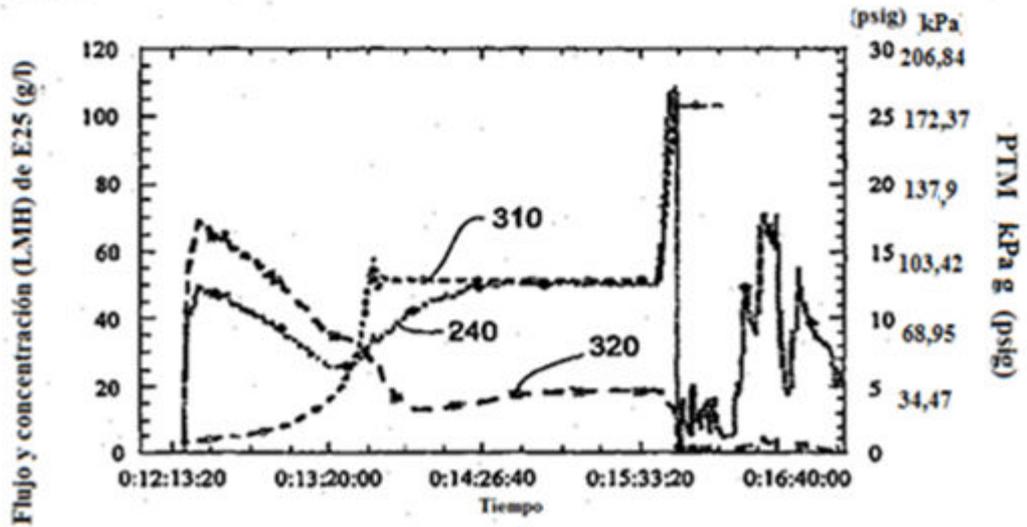
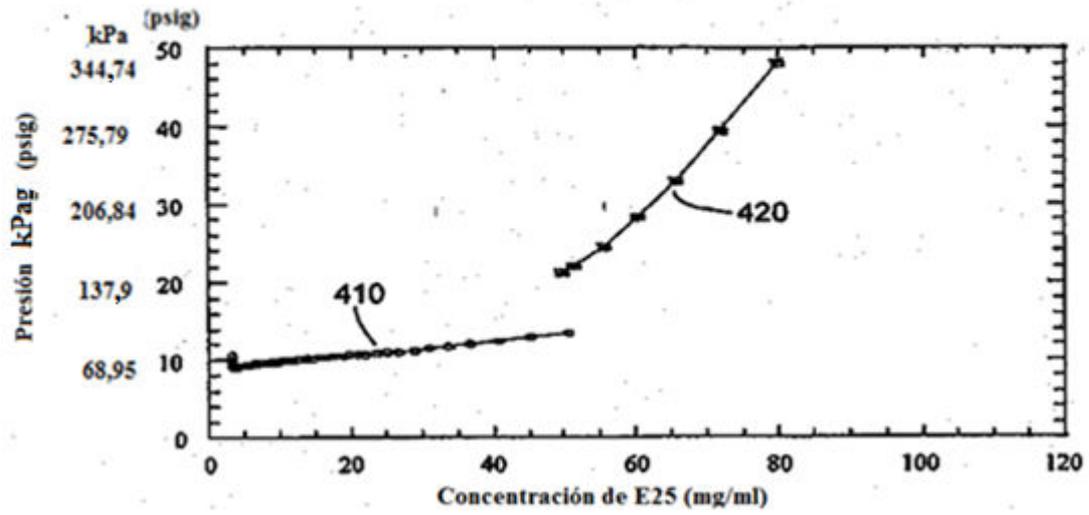


FIG.7



5

FIG.8

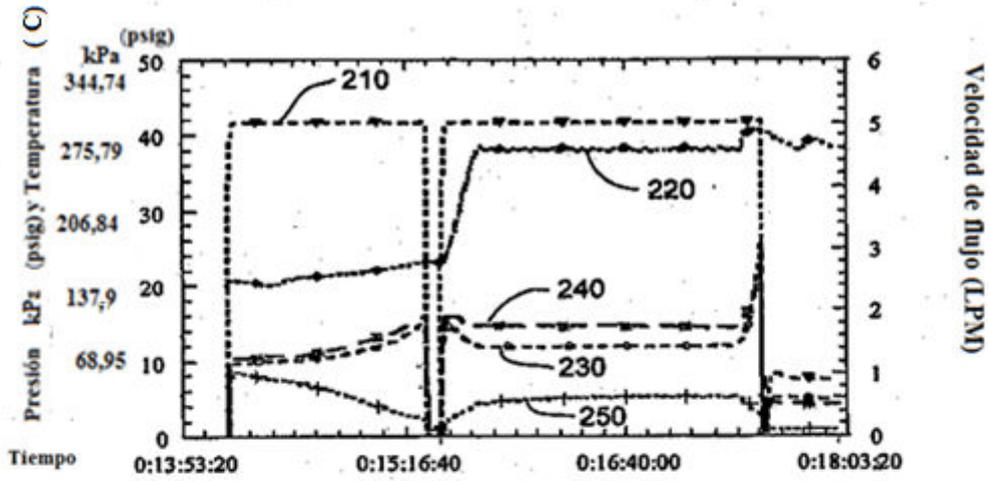


FIG.9

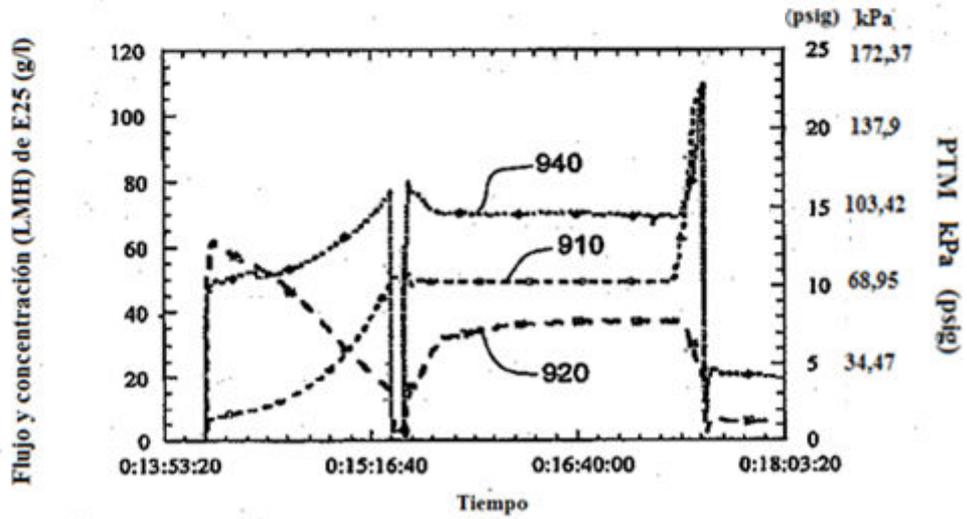


FIG.10

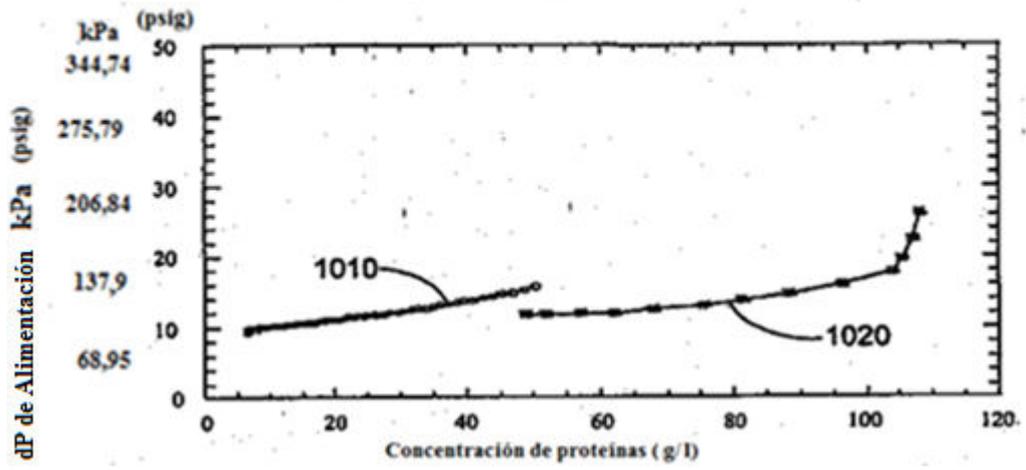


FIG.11

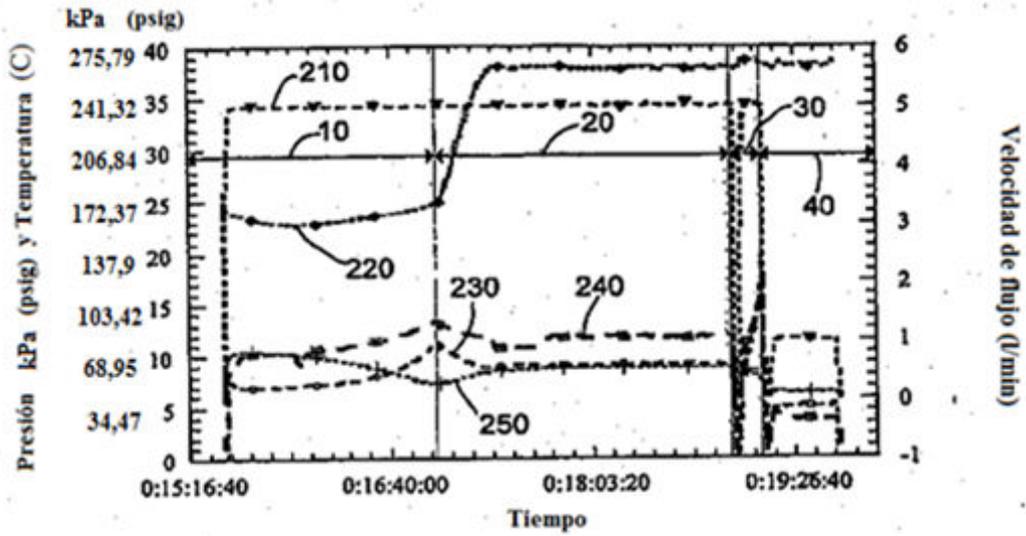


FIG.12

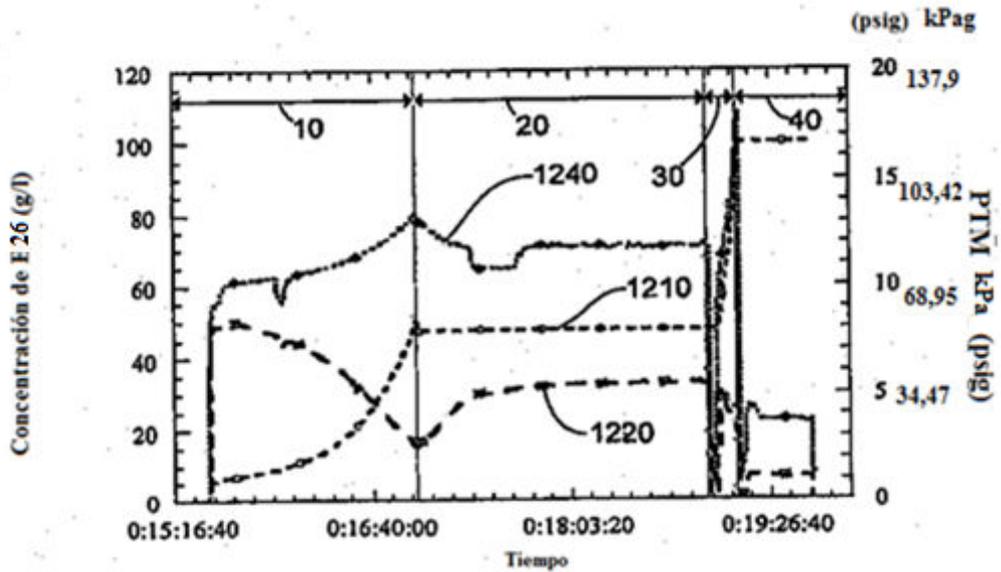


FIG.13

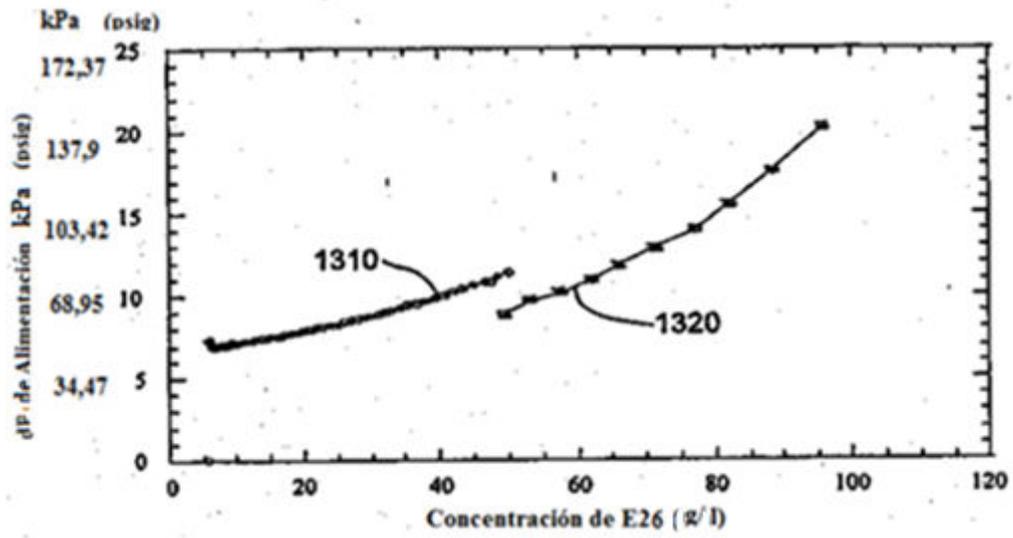


FIG.14

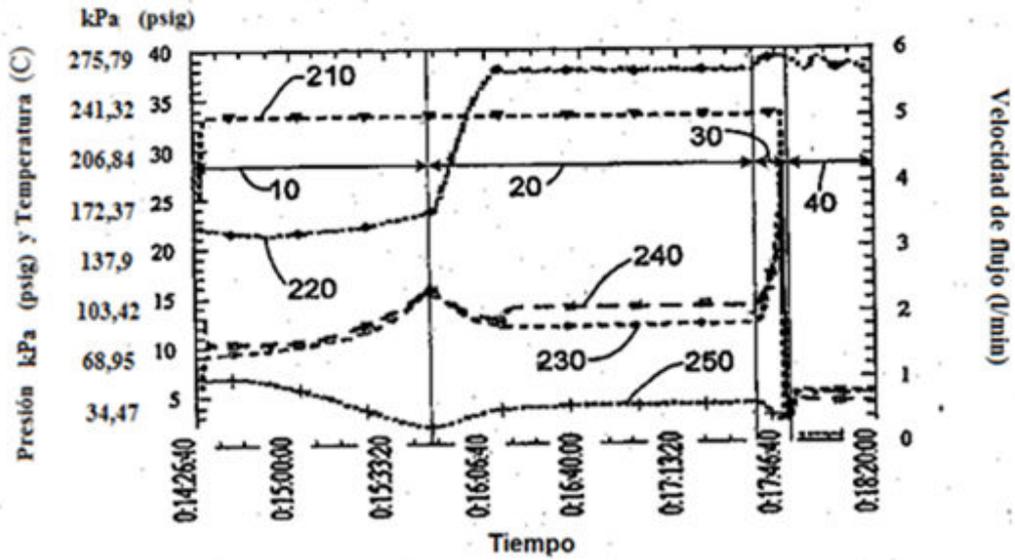


FIG.15

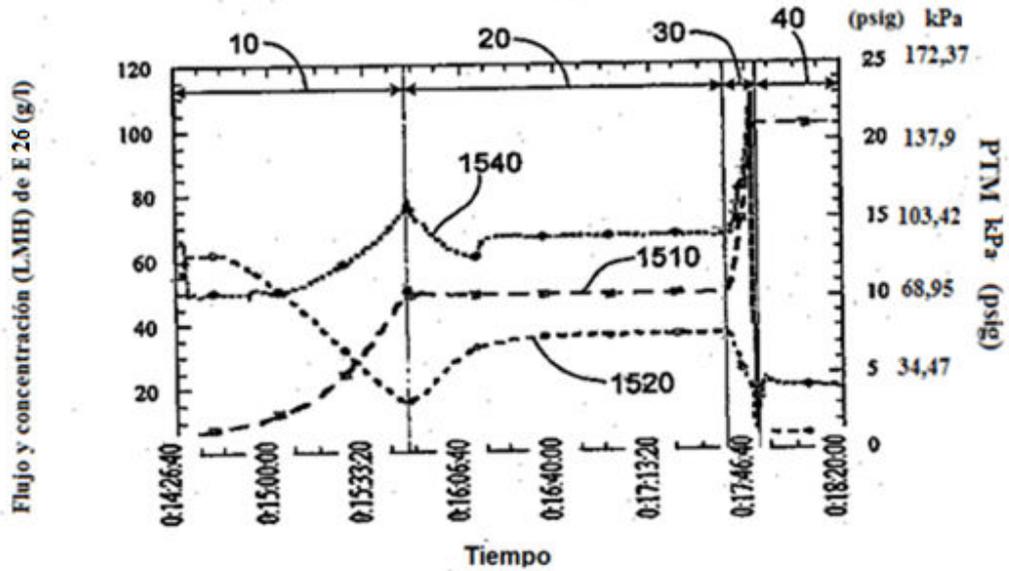


FIG.16

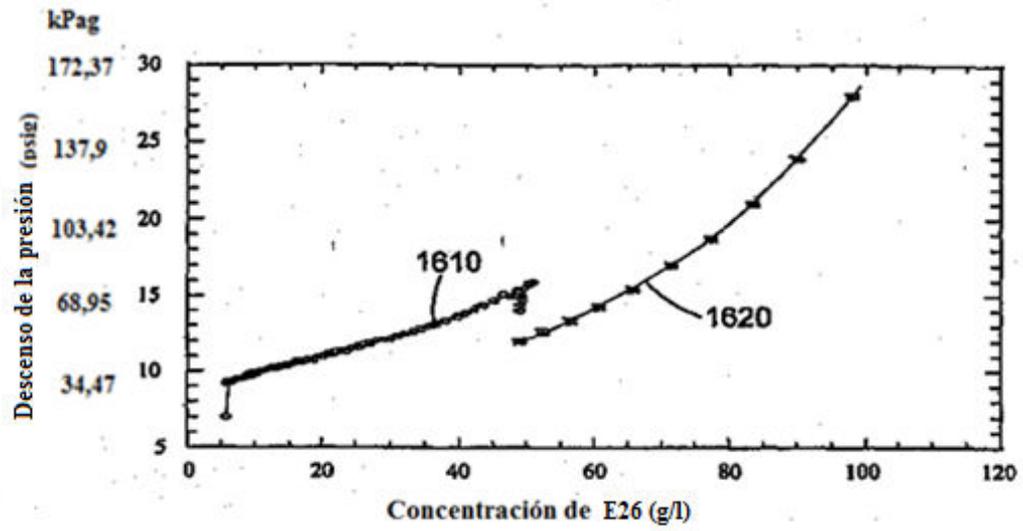


FIG.17

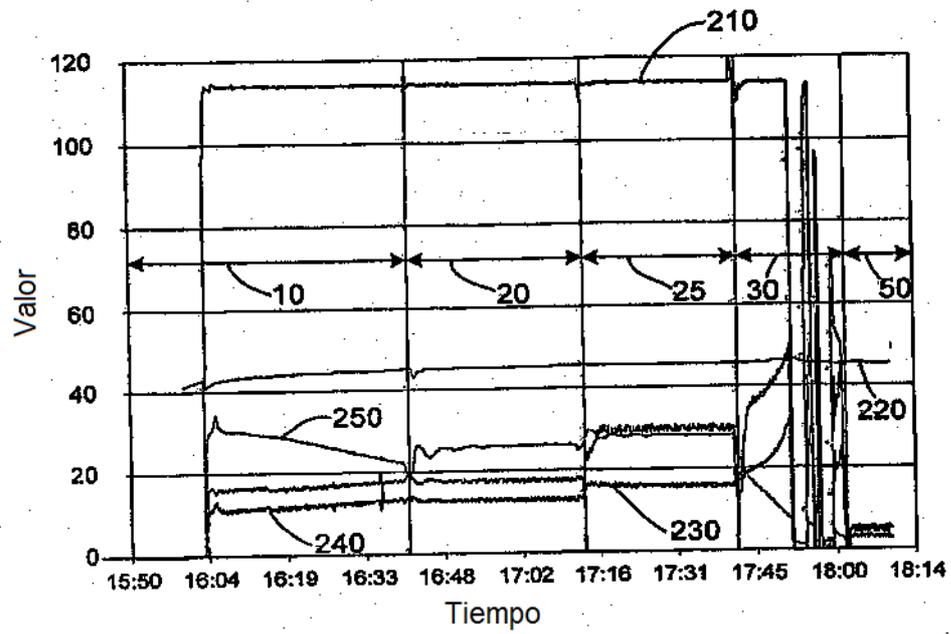


FIG.18

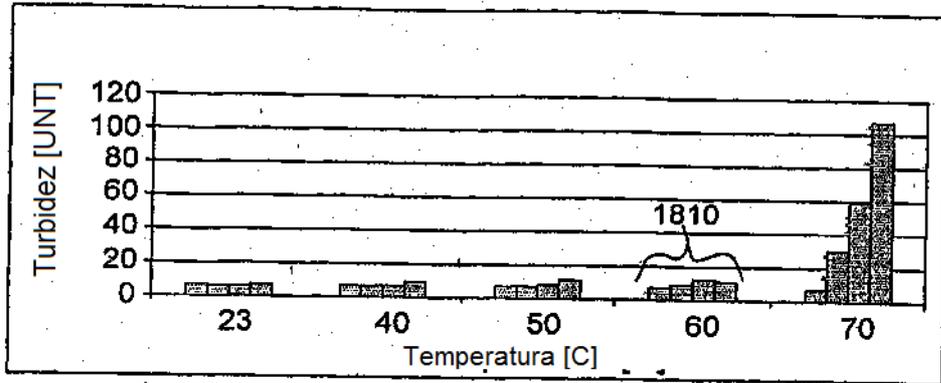


FIG.19

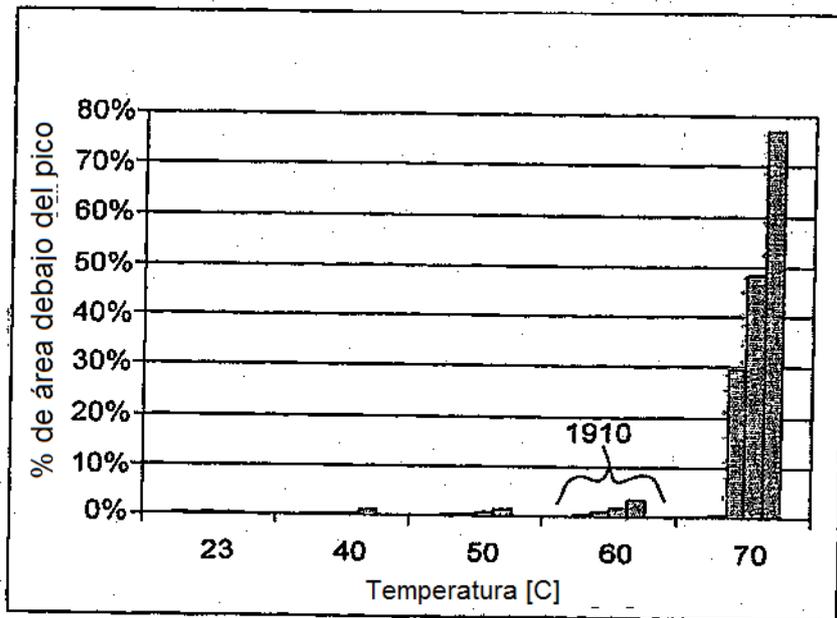


FIG.20

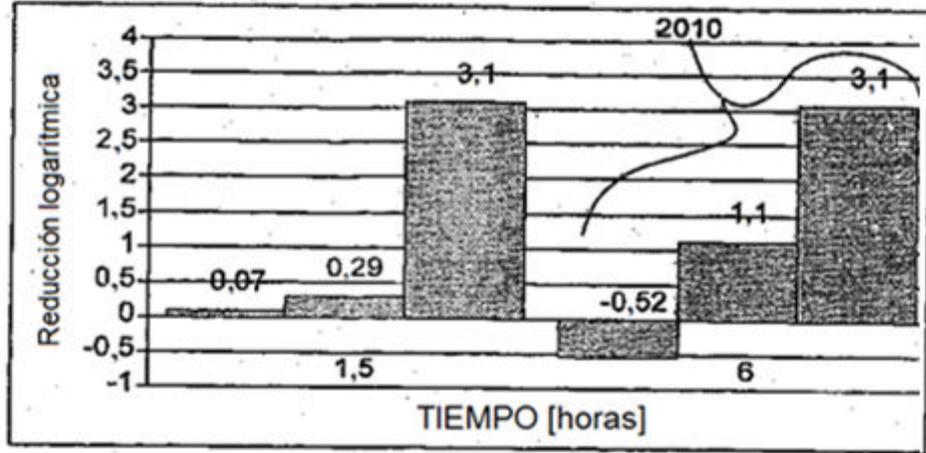


FIG.21

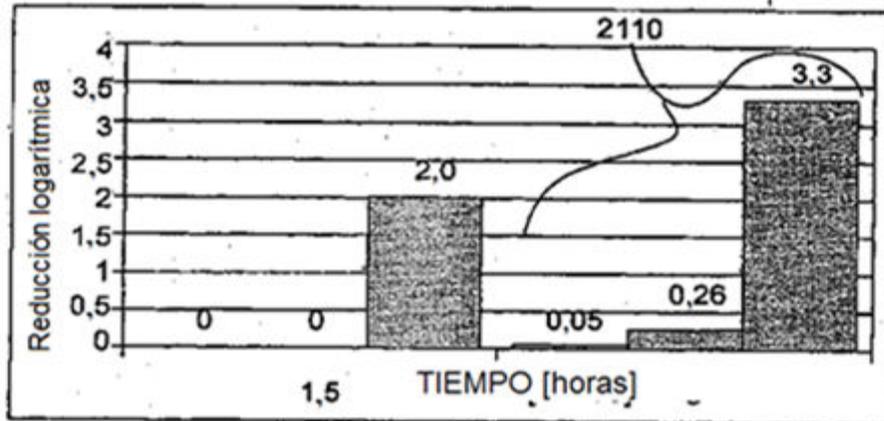


FIG.22

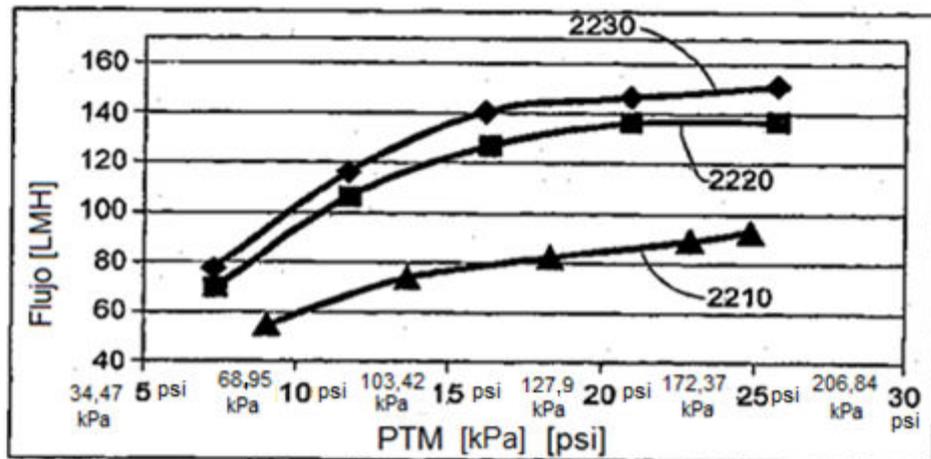


FIG.23

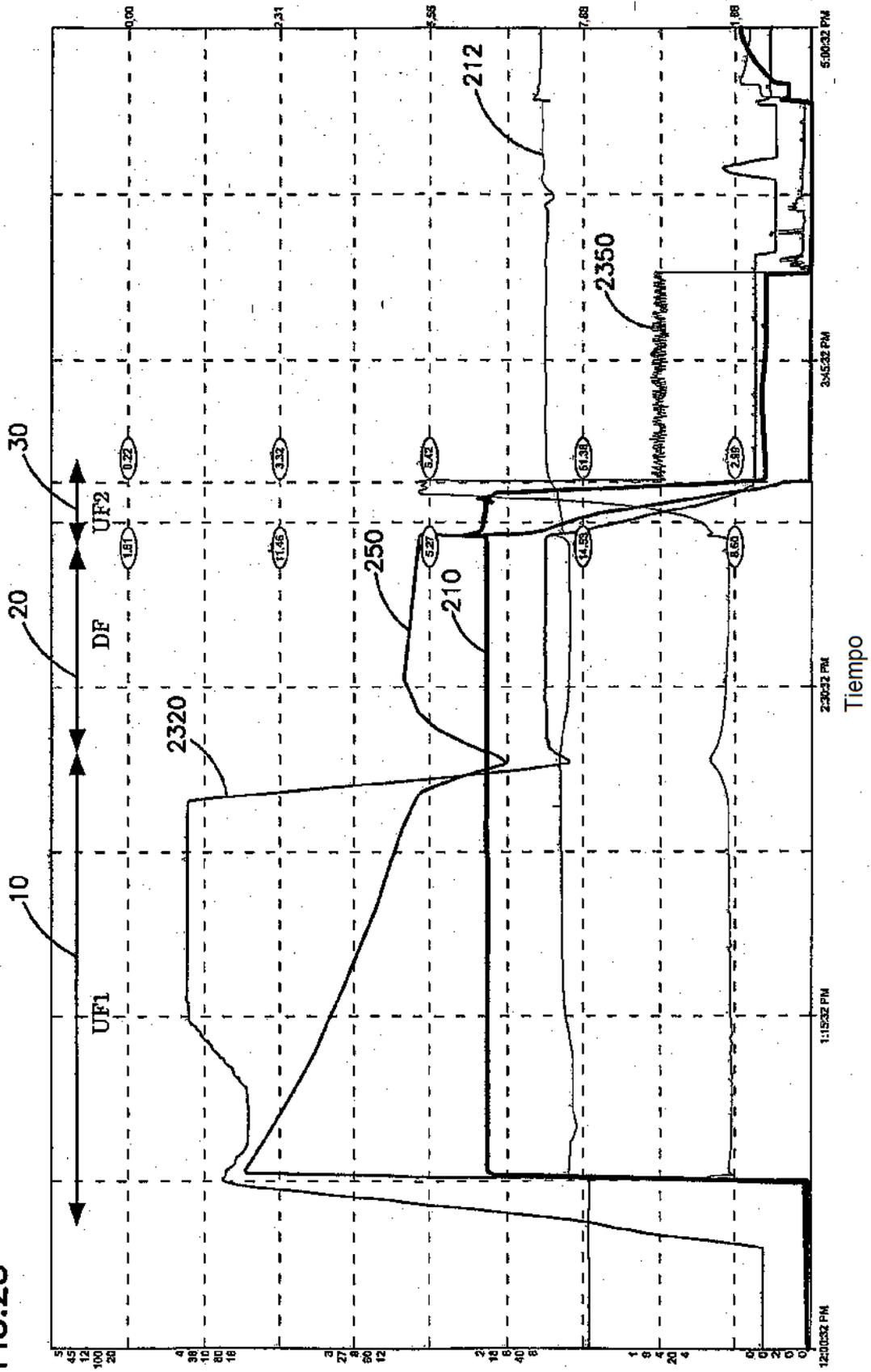


FIG.24

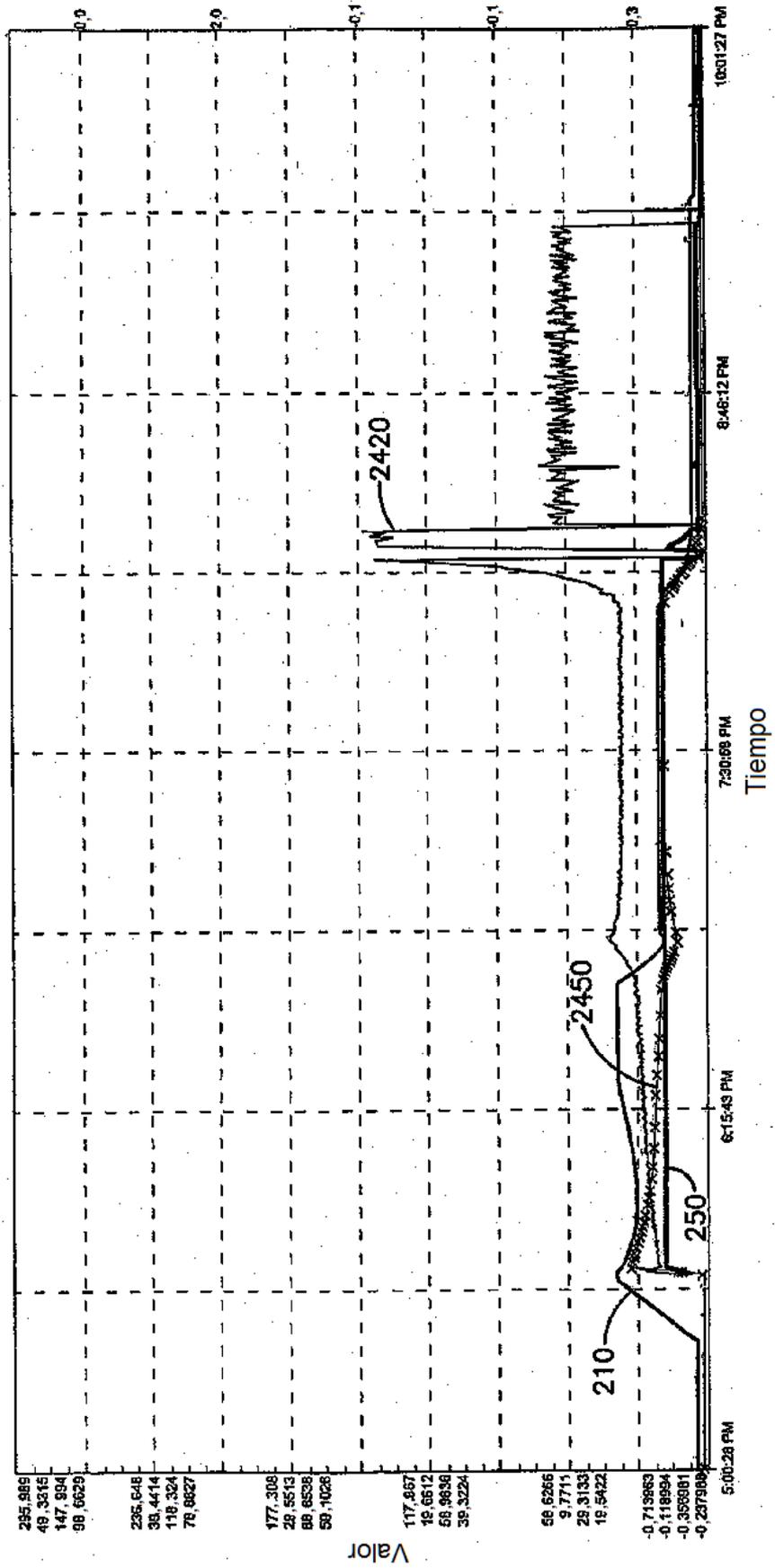


FIG.25

