

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 581**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/06** (2006.01)

**C07K 1/34** (2006.01)

**B01D 61/00** (2006.01)

**B01D 61/14** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**C07K 1/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2010 E 10745660 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2483304**

54 Título: **Ajuste prefiltración de solutos tampón para la preparación de inmunoglobulinas a alta concentración**

30 Prioridad:

**29.09.2009 EP 09012316**

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

**13.09.2016**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 582 581 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

Ajuste prefiltración de solutos tampón para la preparación de inmunoglobulinas a alta concentración

- 5 En la presente memoria se informa de un método para el ajuste prefiltración de la concentración del soluto antes de una filtración de flujo tangencial con el fin de obtener un ingrediente proteico farmacéuticamente activo concentrado.

Antecedentes de la invención

- 10 Los polipéptidos desempeñan un papel importante en el abanico actual de productos médicos. Los sistemas de expresión para la producción de polipéptidos recombinantes son bien conocidos. Para la aplicación en el ser humano toda sustancia farmacéutica debe cumplir claros criterios. Con el fin de garantizar la seguridad de los agentes biofarmacéuticos en el ser humano, por ejemplo los ácidos nucleicos, virus y proteínas de la célula huésped que provocarían graves daños deben ser eliminados. Para cumplir la norma reguladora, tras el procedimiento de fabricación deben llevarse a cabo una o más etapas de purificación. Entre otros, la pureza, la producción y el rendimiento desempeñan un papel importante en la determinación de un procedimiento de purificación apropiado.

- 20 Debido a sus propiedades químicas y físicas, tales como el peso molecular y la arquitectura de dominios, incluyendo las modificaciones secundarias, resulta esencial el procesamiento posterior de las inmunoglobulinas. Por ejemplo, se requieren soluciones concentradas no sólo para los fármacos formulados sino también para intermediarios en el procesamiento posterior (PP) para conseguir volúmenes bajos para una manipulación económica y el almacenamiento de la aplicación. Además, resultan favorecidos los procedimientos de concentración rápidos para garantizar procedimientos sin problemas y tiempos operativos cortos. En el presente contexto, se utilizan procedimientos de filtración de flujo tangencial (FFT).

- 25 Saxena A. et al. informan de técnicas basadas en membranas para la separación y purificación de proteínas (Adv. Colloid Interfacial Sci. 145:1-22, 2009). En el documento nº WO 2009/010269 se informa de un método de filtración de flujo tangencial variable. Mignard D. et al. informan de ensuciamiento durante la ultrafiltración de flujo cruzado de las proteínas (J. Membr. Sci. 186:133-143, 2001). Se informa de un diagrama de optimización para las separaciones de membranas en Van Reis R. et al., J. Membr. Sci. 129:19-29, 1997).

- 30 Se ha informado de no idealidad termodinámica de las soluciones que contienen proteínas durante los procedimientos basados en membranas en Donnan F.G., Z. Elektrochem. 17:572-581, 1911. Stoner et al. (J. Pharm. Sci. 93:2332-2342, 2004) han informado de la concentración de solutos cargados, comprendiendo cloruro, histidina y acetato, durante la diálisis de las diferentes proteínas a las diversas concentraciones de las mismas.

Descripción resumida de la invención

- 40 Un aspecto tal como se informa en la presente memoria es un método de ultrafiltración para concentrar una solución de inmunoglobulinas que comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar una solución de inmunoglobulinas con un valor de pH y con una primera concentración  $S^+$  o  $S^-$  de una sustancia tamponadora,  
 b) ajustar la primera concentración de la sustancia tamponadora a una segunda concentración  $S'$  y mantener el valor del pH, en donde la segunda concentración  $S'$  se calcula con la ecuación 2 en el caso de que la sustancia tamponadora sea una pareja catión/neutro, o con la ecuación 3 en el caso de que la sustancia tamponadora sea una pareja neutro/anión,  
 45 c) concentrar la solución de b) mediante una filtración de flujo tangencial, en la que la ecuación 2 es:

$$S^+ = \frac{-zP + \sqrt{(zP)^2 + 4\left(\frac{S'}{\rho'}\left(\rho - \frac{PM_P}{1000}\right)\right)^2}}{2}$$

- 50 y la ecuación 3 es:

$$S^- = \frac{zP + \sqrt{(zP)^2 + 4\left(\frac{S'}{\rho'}\left(\rho - \frac{PM_P}{1000}\right)\right)^2}}{2}$$

con

la concentración molar en el retenido de solutos cargados positivamente/negativamente ( $S^+/S^-$ ), la carga de la

proteína (z), la concentración molar (P) y el peso molecular (Pm) de la proteína, la densidad de la solución en el retenido (p) y el permeado (p'), y la concentración molar teórica del soluto difundible (S'), en donde la concentración teórica de soluto difundible S' se corrige con un factor de corrección que considera el valor del pH en el que la proporción entre anión del tampón/catión del tampón y ácido del tampón se calcula para cada valor de pH determinado en el retenido mediante la utilización de la ecuación de Henderson-Hasselbach y se utiliza el incremento relativo a cada valor del pH como el factor de corrección respectivo.

En una realización, la sustancia tamponadora es histidina y la segunda concentración se calcula con la ecuación 2. En una realización, el valor del pH es de entre 5,0 y 6,0. En una realización adicional, el valor del pH es 5,5. En otra realización, la primera concentración es de aproximadamente 20 mM. En una realización adicional, la segunda concentración es de entre 24 mM y 37 mM, con una concentración de proteína de la solución concentrada de entre 100 g/l y 300 g/l, respectivamente. En una realización, la concentración de proteína es de aproximadamente 200 g/l y la segunda concentración es de entre 28 mM y 31 mM. En otra realización, la primera concentración es de aproximadamente 46 mM. En una realización adicional, la segunda concentración es de entre 52 mM y 72 mM, con una concentración de proteína de la solución concentrada de entre 100 y 300 g/l, respectivamente. En una realización, la concentración de proteína es de aproximadamente 200 g/l y la segunda concentración es de entre 59 mM y 62 mM.

En otra realización, la sustancia tamponadora es acetato y la concentración se calcula con la ecuación 3. En una realización, el valor del pH es de entre 4,5 y 6,0. En una realización adicional, el valor del pH es 5,5. En otra realización, la primera concentración es de aproximadamente 20 mM. En una realización adicional, la segunda concentración es de entre 8 mM y 19 mM, con una concentración de proteína de la solución concentrada de entre 100 g/l y 300 g/l, respectivamente. En una realización, la concentración de proteína es de aproximadamente 200 g/l y la segunda concentración es de entre 12 mM y 17 mM. En otra realización, la primera concentración es de aproximadamente 45 mM. En una realización adicional, la segunda concentración es de entre 41 mM y 48 mM, con una concentración de proteína de la solución concentrada de entre 300 y 100 g/l, respectivamente. En una realización, la concentración de proteína es de aproximadamente 200 g/l y la segunda concentración es de entre 43 mM y 47 mM.

En una realización, la inmunoglobulina es un anticuerpo anti-selectina P o un anticuerpo anti-A $\beta$ .

Otro aspecto tal como se informa en la presente memoria es un método para producir una inmunoglobulina in vitro, comprendiendo:

a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico codificante de la inmunoglobulina, b) recuperar la inmunoglobulina a partir del medio de cultivo o la célula de la etapa a), c) purificar la inmunoglobulina, d) concentrar la inmunoglobulina con un método tal como se informa en la presente memoria, para producir de esta manera una inmunoglobulina.

#### Descripción detallada de la invención

En la presente memoria se informa de un método de filtración de flujo tangencial con un ajuste de la concentración de soluto prefiltración con el fin de garantizar una concentración definida de los componentes de la solución tras la filtración de flujo tangencial.

La expresión "pareja catión/neutro" se refiere a una sustancia tamponadora que proporciona un sistema tamponador que consiste de la sustancia tamponadora en forma neutra y la sustancia tamponadora en forma protonada, es decir, con carga positiva, como catión. Un ejemplo del mismo es la histidina. La expresión "pareja neutro/anión" se refiere a una sustancia tamponadora que proporciona un sistema tamponador que consiste de la sustancia tamponadora en forma neutra y la sustancia tamponadora en forma desprotonada, es decir, en forma cargada negativamente, como anión. Un ejemplo es el acetato.

La expresión "filtración de flujo tangencial" o, abreviadamente, "FFT", se refiere a un procedimiento de filtración en el que una solución que contiene un polipéptido que debe concentrarse fluye a lo largo, es decir, tangencialmente, a la superficie de una membrana de filtración. La membrana de filtración presenta un tamaño de poro con un determinado valor de corte. En una realización, el valor de corte se encuentra comprendido en el intervalo de entre 20 y 50 kDa; en otra realización, es de 30 kDa. La FFT se llevó a cabo como ultrafiltración. La expresión "flujo cruzado" se refiere al flujo de la solución que debe concentrarse tangencialmente a la membrana (flujo del retenido). El término "flujo" o "flujo de filtrado", que pueden utilizarse intercambiablemente, se refiere al flujo de líquido a través de la membrana, es decir, a través de los poros de la membrana. Es decir, se refiere a la tasa volumétrica del flujo de filtrado a través de la membrana. El flujo habitualmente se expresa en términos de volumen por unidad de área de membrana por unidad de tiempo, en litros/m<sup>2</sup>/h (LMH). El filtrado comprende el solvente de la solución que debe concentrarse en el lado del filtrado, así como moléculas con un peso molecular inferior al valor de corte de la

membrana utilizada, pero no el polipéptido que debe concentrarse. La expresión "presión transmembranal" o "PTM", que pueden utilizarse intercambiamente, se refiere a la presión que se aplica para impulsar el solvente y los componentes menores que el valor de corte de la membrana a través de los poros de la misma. La presión transmembranal es una presión media de la entrada, la salida y el filtrado y puede calcularse como:

5

$$PTM = \frac{(p_{dentro} + p_{fuera})}{2} - p_{filtrado}$$

(ecuación 1)

10

El término "soluto" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a todos los componentes, es decir los iónicos y los no iónicos, de una solución que debe concentrarse excepto las moléculas de agua y las moléculas del polipéptido que debe concentrarse. Generalmente la solución que debe concentrarse comprende un polipéptido, agua y una sal tampón, y opcionalmente una sal no tampón, tal como cloruro sódico.

15

Un "polipéptido" es un polímero que consiste de residuos aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, producidos natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos aminoácidos se denominan "péptidos". Una proteína es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas o por lo menos una cadena polipeptídica de más de 100 residuos aminoácidos. Un polipéptido puede comprender además componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden ser añadidos a un polipéptido por la célula en la que se produce el polipéptido variará según el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en la presente memoria en términos de sus estructuras del esqueleto de aminoácidos; algunos sustituyentes, tales como grupos carbohidratos, no se especifican generalmente, aunque sin embargo pueden encontrarse presentes.

20

25

El término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste de uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Entre los genes de inmunoglobulina reconocidos se incluyen los diferentes genes de región constante, así como la multitud de genes de región variable de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en una diversidad de formatos, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como cadenas sencillas (scFv) o dímeros (en general, Hood L.E. et al., Immunology, The Benjamin, N.Y., 2a edición, 1984). De esta manera, el término "inmunoglobulina" se refiere a una inmunoglobulina completa que consiste de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, así como un "fragmento de inmunoglobulina" que comprende por lo menos un dominio seleccionado de entre el dominio variable, el dominio C<sub>H1</sub>, la región bisagra, el dominio C<sub>H2</sub>, el dominio C<sub>H3</sub> o el dominio C<sub>H4</sub> de una cadena pesada, o el dominio variable o el dominio C<sub>L</sub> de una cadena ligera y un "conjugado de inmunoglobulinas" que comprende por lo menos un dominio de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina conjugado mediante un enlace peptídico con un polipéptido adicional. El polipéptido adicional es un péptido no inmunoglobulina, tal como una hormona, o toxina, o receptor de crecimiento, o péptido antifusogénico, o factor complemento, o similar.

30

35

40

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

45

50

Una serie de diferentes métodos se encuentran bien establecidos y son ampliamente utilizados para la recuperación y purificación de proteínas, tales como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo la cromatografía de afinidad de proteína A o de proteína G), la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo de intercambio catiónico (resinas carboximetilo), de intercambio aniónico (resinas aminoetilo) y de intercambio de modo mixto), la adsorción tiofílica (por ejemplo con beta-mercaptoetanol y con otros ligandos de SH), la cromatografía de interacción hidrofóbica o de adsorción aromática (por ejemplo con fenil-sefarosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), la cromatografía de afinidad de quelato metálico (por ejemplo con material de afinidad por el Ni(II) y por el Cu(II)), la cromatografía de exclusión por tamaño, y métodos electroforéticos (tales como la electroforesis en gel y la electroforesis capilar). Estos métodos pueden combinarse independientemente en diferentes realizaciones de la presente invención.

55

La expresión "inmunoglobulina en forma monomérica" y los equivalentes gramaticales de la misma se refieren a una molécula de inmunoglobulina no asociada a una segunda molécula de inmunoglobulina, es decir ni covalentemente ni no covalentemente a otra molécula de inmunoglobulina. La expresión "inmunoglobulina en forma agregada" y

equivalentes gramaticales de la misma se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se encuentra asociada, covalente o no covalentemente, a por lo menos una molécula adicional de inmunoglobulina o fragmento de la misma, y que se eluye en un único pico a partir de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño. La expresión "en forma monomérica" y equivalentes gramaticales de la misma tal como se utiliza en la presente solicitud no se refiere necesariamente a que el 100% de una molécula de inmunoglobulina se encuentra presente en forma monomérica. Se refiere a que una inmunoglobulina se encuentra esencialmente en forma monomérica, es decir, por lo menos 90% de la inmunoglobulina se encuentra en forma monomérica, en una realización por lo menos 95% de la inmunoglobulina se encuentra en forma monomérica, en otra realización por lo menos 98% de la inmunoglobulina se encuentra en forma monomérica, en una realización adicional por lo menos 99% de la inmunoglobulina se encuentra en forma monomérica, y en una realización adicional más de 99% de la inmunoglobulina se encuentra en forma monomérica, determinada como el área de pico de una cromatograma de exclusión por tamaño de la preparación de inmunoglobulinas. La expresión "en forma monomérica y en forma agregada" se refiere a una mezcla de moléculas de inmunoglobulina no asociadas a otras moléculas de inmunoglobulina y de moléculas de inmunoglobulina asociadas a otras moléculas de inmunoglobulina. En dicha mezcla, ni la forma monomérica ni la forma agregada se encuentra presente de manera exclusiva. La expresión "forma de elevado peso molecular (EPM)" se refiere a una inmunoglobulina polimérica, es decir, agregada, en la que el agregado todavía es soluble en una solución tamponada acuosa.

El término "100%" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a que la cantidad de componentes diferentes de un componente especificado es inferior al límite de detección del método analítico al que se hace referencia bajo las condiciones especificadas.

Los términos "90%", "95%", "98%", "99%" tal como se utilizan en la presente solicitud se refieren no a valores exactos sino a valores dentro de la precisión del método analítico al que se hace referencia, bajo las condiciones especificadas.

Generalmente la cromatografía de intercambio iónico en modo de elución es la etapa cromatográfica final en los procedimientos de purificación de las inmunoglobulinas monoclonales para eliminar el ADN residual de la célula huésped, las endotoxinas y las partículas de tipo retroviral. Por lo tanto, la agrupación de cromatografía de intercambio iónico purificada se encuentra en, por ejemplo, un tampón de fosfato o de tris(hidroximetil)-aminometano. Posteriormente las condiciones deben cambiarse a un sistema tampón para, por ejemplo, garantizar la estabilidad del ingrediente farmacéutico activo durante el almacenamiento. Generalmente el valor del pH es ligeramente ácido, por ejemplo de entre 5 y 6, y con frecuencia se requiere una conductividad inferior a 5 mS/cm (Daugherty A.L. y Mrsny R.J., Adv. Drug Deliv. Rev. 58:686-706, 2006).

Concomitantemente, la agrupación de intercambio iónico es el tampón base para la formulación mediante la utilización/adición de diferentes soluciones madre de excipientes como surfactantes y azúcares. Por lo tanto, la agrupación de cromatografía de intercambio iónico se concentra y se diafiltra en una composición tampón adecuada mediante ultrafiltración con el fin de proporcionar una composición definida de proteínas, solutos tampón, pH y conductividad.

Las interacciones electrostáticas de iones y polipéptidos a valores de pH no isoeléctrico conducen a una división desigual de los mismos durante un procedimiento de ultrafiltración en el lado de retenido y en el lado de permeado de la membrana de ultrafiltración. Lo anterior resulta en una variación significativa de la concentración de soluto antes y después de la filtración de flujo tangencial (para la concentración y diafiltración) y resulta en variaciones del pH y la conductividad antes, durante y después de la filtración de flujo tangencial.

Por ejemplo, una agrupación de inmunoglobulinas de cromatografía de intercambio iónico se diafiltró frente a tampón de histidina 20 mM (pH 5,5, 1,6 mS/cm) de un volumen de diafiltración (VD) de 1 a 10 veces con respecto al volumen de agrupación. A continuación, la agrupación diafiltrada se concentró a más de 210 mg/ml de concentración de proteína en una filtración de flujo tangencial. Se ha encontrado que incluso tras aplicar un volumen de diafiltración de 10 veces, las condiciones predefinidas para el sistema tampón de histidina referidas al valor del pH y la conductividad no pudieron mantenerse constantes tras completar el procedimiento de concentración. Tras iniciar el procedimiento de concentración, el valor del pH se incrementó a 5,7 y la conductividad alcanzó 2,2 mS/cm a una concentración de proteínas de 215 mg/ml en el retenido.

Además, se realizó un seguimiento de la conductividad y del pH durante el procedimiento de concentración de UF en tampón de histidina 20 mM a pH 5,5. Con una concentración incrementada de proteínas se observó nuevamente un incremento de la conductividad. Además, también se observó un incremento del valor del pH hasta 5,8.

Se llevó a cabo una observación diferente aunque también similar durante un procedimiento de concentración mediante UF con otro sistema tampón (tampón de acetato 20 mM a pH 5,5). Durante el procedimiento de UF, el valor del pH se incrementó a 5,8, de manera similar a la observada con el tampón de histidina 20 mM, aunque la

conductividad se redujo a mayores concentraciones de proteína. Se observó esencialmente lo mismo a una concentración de acetato más alta, de 45 mM, a pH 5,0.

5 Durante el procedimiento de concentración mediante UF de la inmunoglobulina monoclonal en dos sistemas tampón definidos diferentes, se observó una acumulación significativa de la sustancia tampón en el caso del acetato en el retenido, y una pérdida significativa de la sustancia tampón en el caso de la histidina en el retenido (ver, por ejemplo, las figuras 1 y 3). La concentración de acetato prácticamente se duplicó, mientras que la concentración de histidina se redujo a la mitad, a una concentración de inmunoglobulina de aproximadamente 200 mg/ml. Ambos indujeron cambios de conductividad y del pH durante el procedimiento de concentración.

10 La división desigual de los compuestos solutos durante las operaciones de diafiltración y concentración resultaron en concentraciones de excipiente, pH y conductividad que eran significativamente diferentes de las del tampón de diafiltración al inicio del procedimiento. Debido a que lo anterior puede influir sobre la estabilidad de la inmunoglobulina formulada final, se requiere la concentración de compuesto soluto prefijada en la preparación de inmunoglobulina concentrada.

15 Son posibles diferentes opciones para corregir los cambios durante la filtración de flujo tangencial:

- 20 - reposición/dilución con solución tampón tras la concentración,
- ajuste del valor de pH a un valor próximo al valor del punto isoeléctrico antes de la filtración de flujo tangencial (ver, por ejemplo, la figura 2),
- adición/reducción definida de soluto antes de la filtración de flujo tangencial (ver, por ejemplo, la figura 4).

25 La dilución tras la UF con solución tampón no resulta adecuada, ya que resultará también en una dilución y reducción de la concentración de inmunoglobulina. Lo anterior es exactamente lo contrario del objetivo del procedimiento de UF de proporcionar soluciones de inmunoglobulinas concentradas.

30 Ahora se ha encontrado que la adición/reducción definida de concentración de soluto antes del procedimiento de filtración de flujo tangencial resulta ventajosa para corregir los cambios de concentración con independencia del dispositivo de concentración, material de la membrana y parámetros de concentración. Se ha encontrado que, tal como en una realización de tampón de histidina (=soluta), se requiere un ajuste a pH aproximadamente 5,0 a 29,6 mM y 60 mM de histidina, respectivamente, antes de la filtración de flujo tangencial, para alcanzar una concentración predefinida de tampón de histidina de 20 mM y 46 mM de histidina, respectivamente, tras la filtración de flujo tangencial en la concentración de una inmunoglobulina de la clase IgG1 e IgG4 a 215 mg/ml.

35 En un modo alternativo de considerar los cambios de concentración durante el procedimiento de ultrafiltración, se reajustaron los concentrados a un valor de pH de 5,0 mediante la adición de ácido clorhídrico (HCl) a 0,5 M a la solución bajo agitación tras el procedimiento de UF. Lo anterior sólo resultó necesario para las soluciones que se concentraron a pH 7,5 y con histidina 20 mM, pH 5,0, debido al cambio del pH durante la UF. Los experimentos, realizados con histidina 29,6 mM, pH 5,0, no mostraron un cambio de pH tal como se ha indicado anteriormente. La Tabla 1 muestra los valores del pH antes de la UF, después de la UF y tras el reajuste a pH 5,0.

45 Tabla 1: valores de pH antes de la UF, después de la UF y para el producto final con pH reajustado a 5,0; se utilizó ácido clorhídrico 0,5 M para reajustar el pH a 5,0 en el producto final; se proporcionan los valores medios de tres mediciones  $\pm$ SD.

Condiciones iniciales	pH antes de la UF	pH después de la UF	pH del producto final
Tampón de histidina 20 mM, pH 5,0	4,97 +/- 0,04	5,40 +/- 0,06	4,90 +/- 0,14
Tampón de histidina 32 mM, pH 5,0	5,0 +/- 0,04	5,20 +/- 0,05	--
Tampón de histidina 20 mM, pH 7,4	7,37 +/- 0,06	7,47 +/- 0,05	4,81 +/- 0,22

El ajuste de la concentración de soluto antes de la UF se calculó basándose en las ecuaciones 2 y 3, a continuación.

$$S^+ = \frac{-zP + \sqrt{(zP)^2 + 4\left(\frac{S'}{\rho} \left(\rho - \frac{PM_P}{1000}\right)\right)^2}}{2}$$

(ecuación 2)

50 La Ecuación 2 describe la concentración molar en el retenido en el que los solutos con carga positiva ( $S^+$ ) pueden pasar la membrana.  $S^+$  depende de la carga de la proteína ( $z$ ), de la concentración molar ( $P$ ) y del peso molecular

(Pm) de la proteína, sí como de la densidad de la solución en el retenido (ρ) y en el filtrado (ρ'). S' es la concentración molar teórica del soluto difundible.

$$S^- = \frac{zP + \sqrt{(zP)^2 + 4\left(\frac{S'}{\rho'}\left(\rho - \frac{PM_p}{1000}\right)\right)^2}}{2}$$

(ecuación 3)

5 La Ecuación 3 describe la concentración molar en el retenido en el que los solutos con carga negativa (S<sup>-</sup>) pueden pasar la membrana.

10 Para una inmunoglobulina ejemplar contra el péptido amiloide β (anticuerpo anti-Aβ) tal como se informa en el documento nº WO 2003/070760 o nº US 2005/0169925, el cálculo se lleva a cabo tal como se indica de manera general a continuación.

15 Para obtener una solución con una concentración final de inmunoglobulina de 200 mg/ml en tampón de histidina 20 mM a pH 5,5. La concentración de histidina antes de que se calcule la etapa de concentración con la ecuación 2 reorganizada para calcular S' como molécula de soluto es una molécula con carga positiva.

La Ecuación 2 reorganizada (ecuación 2') es:

$$S' = \sqrt{\frac{(2*[S^+] + z*P)^2 - (z*P)^2}{4}} \cdot \frac{P * M_p}{\rho - \frac{1000}}{1000}} \quad \text{(ecuación 2')}$$

Se utilizaron los valores siguientes de los parámetros:

masa molecular de la inmunoglobulina:	150.000 g/mol
densidad del permeado:	0,9989 g/ml
concentración molar a la concentración final:	0,00133 moles/l
carga de la proteína: (para la determinación, ver el Ejemplo 13)	+9
concentración inicial de proteína: (para la determinación, ver el Ejemplo 4)	15 mg/ml
concentración de tampón diana:	0,020 M
densidad de la solución de proteína al final de la concentración: (para la determinación, ver el Ejemplo 14)	1.055,1 g/ml

20 Los valores se introdujeron en la Ecuación 2', resultando en:

**[concentración de histidina antes de la concentración]**

$$= \frac{(((2*0,020 + 9*0,00133)^2 - (9*0,00133)^2)*0,25)^{1/2}}{1,0551 - (0,00133*150.000)/1000} * 0,9989 \text{ mol/l}$$

$$= 0,02955 \text{ mol/l} = 29,6 \text{ mM}$$

25 Por lo tanto, con el fin de llevar a cabo el cálculo, por ejemplo para una concentración final de 200 mg/ml, deben determinarse experimentalmente la carga de la inmunoglobulina que debe concentrarse según el Ejemplo 13, la densidad de la solución de inmunoglobulinas tras la concentración según el Ejemplo 14, y la concentración de la inmunoglobulina en la solución inicial de inmunoglobulina según el Ejemplo 4.

30 También resulta posible utilizar valores de la literatura para la densidad de la solución inicial, según la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2: densidad de soluciones de proteínas.

concentración de proteína [mg/ml]	densidad de la solución [g/ml]
15	1,0105
28	1,0140
41	1,0174
55	1,0211
68	1,0246
85	1,0291
100	1,0331
112	1,0362
120	1,0384
138	1,0431
185	1,0556
200	1,0596

La Ecuación 3 reorganizada (ecuación 3') es:

$$S' = \frac{\sqrt{(2 * [S^+] - z * P)^2 - (z * P)^2}}{4} * \rho' \quad \text{(ecuación 3')}$$

$$\rho = \frac{P * M_p}{1000}$$

5

En el caso de una sal tampón aniónica (soluto) debido al incremento del valor del pH durante el procedimiento de UF, el porcentaje de sal tampón (soluto) en forma aniónica también se incrementa. Por lo tanto, en la práctica se pierden más aniones de sal tampón que las repuestas según el cálculo utilizando las ecuaciones anteriormente proporcionadas sin considerar el valor del pH. Por lo tanto, la concentración de soluto difundible teórica S' debe corregirse utilizando un factor que considera el valor del pH. La proporción entre anión de tampón/catión de tampón y ácido del tampón puede calcularse para cada valor de pH determinado en el retenido mediante la utilización de la ecuación de Henderson-Hasselbach. El incremento relativo a cada valor de pH puede utilizarse como el factor de corrección respectivo.

15

Se aproximó la concentración molar de soluto mediante la inserción del valor de carga real de la inmunoglobulina al valor del pH en las ecuaciones 2 y 3, respectivamente. Se determinó la carga global de la proteína mediante mediciones del potencial zeta (ver el Ejemplo 13).

Se encuentran disponibles varias posibilidades para determinar la valencia de la proteína dependiendo del valor del pH. Aparte de las curvas de titulación calculadas basadas en la secuencia proteica mediante la combinación de los valores de pK<sub>a</sub> medios de todas las cadenas laterales de aminoácidos ácidos y básicas, resulta posible la determinación experimental basada en la movilidad electroforética, al igual que la medición del potencial zeta (FAude A. et al., J. Chromatogr. A 1161:29-35, 2007; Salinas B.A., J. Pharm. Sci. 99:82-93, 2009) o la electroforesis en gel y capilar (Winzor D.J. et al., Anal. Biochem. 333:225-229, 2004). Debido a que la valencia de la proteína depende no sólo del pH sino también de la composición de electrolitos del tampón del medio, no se dispone de ninguna alternativa realista para determinar la carga real de la proteína.

25

Se concentraron dos soluciones de inmunoglobulinas (ver la sección de Ejemplos para más información) de 15 mg/ml a 200 mg/ml. Una solución utilizada contenía histidina 20 mM a pH 5,0, y una solución utilizada contenía histidina 20 mM a pH 5,5 antes de la UF. Ambas soluciones de inmunoglobulinas debían presentar histidina 20 mM al pH predefinido tras el procedimiento de concentración. Durante la UF, se observó el desplazamiento de la histidina, que se corrigió cuantitativamente mediante la utilización de la Ecuación 2 con una carga de proteína de +11. A una concentración de inmunoglobulinas de 200 mg/m, sólo quedaba 10,8 mM de histidina sin reposición antes de la UF. Se calculó que debían encontrarse presentes 29,6 mM de histidina antes de la UF, para acabar con 20 mM de histidina tras el procesamiento a una concentración de proteína de 200 mg/ml. Los datos experimentales con un sistema tampón que contenía 30,3 ± 0,7 mM de histidina a pH 5,5 demostraron que los concentrados de 200 mg/ml mostraban una concentración de histidina de 18,6 ± 0,4 mM, tal como se había predicho. De esta manera, se confirmó que, mediante la utilización de una concentración de histidina más alta al inicio de la UF, calculada mediante la utilización de la Ecuación 2', la concentración pretendida de histidina se encontraba presente tras la UF hasta una concentración diana de proteína de 200 mg/ml.

40

Además, la concentración de histidina deseada de 46 mM a una concentración de proteína de 200 mg/ml puede alcanzarse mediante la aplicación de una concentración de histidina inicialmente más alta, de 60 mM, antes de la UF, tal como se calcula utilizando la ecuación 2'. En este caso se aplica una carga de la proteína de +7.

5 En el caso de la histidina, la molaridad de soluto más alta calculada antes de iniciar el procedimiento de concentración mediante UF resultó en las molaridades deseadas de histidina en las soluciones concentradas. Además, durante y después del procedimiento de UF, el valor del pH permaneció prácticamente constante en comparación con los experimentos llevados a cabo a una molaridad más baja.

10 A una concentración de proteína de 200 mg/ml, el valor del pH cambió de pH  $5,44 \pm 0,04$  a pH  $5,80 \pm 0,05$ , en el caso de que la concentración de histidina no se incrementase a 29,6 mM de histidina antes de la UF. En el caso de que la concentración de histidina se incrementase a 29,6 mM, el pH era prácticamente constante, es decir, pH  $5,45 \pm 0,04$  antes y pH 5,57 después del procesamiento mediante UF.

15 Se ha encontrado además que no resultaba necesario un ajuste del valor del pH.

En el caso de que el valor del pH se ajustase a un valor próximo al punto isoeléctrico antes del procedimiento de filtración de flujo tangencial, se inducía la formación de agregados y partículas durante el procedimiento de filtración de flujo tangencial. En contraste con lo anterior, la corrección sistemática de los parámetros de concentración antes del procedimiento de filtración de flujo tangencial no induce la formación de agregados y/o partículas.

20 Se inmunofiltraron soluciones de inmunoglobulinas a una concentración de 20 mg/ml hasta 200 mg/ml. Se utilizaron sistemas tampón basados en histidina. Por una parte, se llevaron a cabo experimentos en un tampón de histidina 29,6 mM, pH 5,0. Por otra parte, se llevó a cabo la UF en un tampón de histidina 20 mM, pH 7,4. Se compararon los resultados con los de experimentos llevados a cabo en un sistema de tampón que contenía histidina 20 mM a pH 5,0 (ver las figuras 6 y 7).

25 Se observó que la formación de partículas durante la UF se incrementaba a pH 7,4. Durante el curso de la UF, se formaban hasta  $8 \times 10^6$  partículas de tamaño superior a 1  $\mu$ m y la turbidez se incrementa de 0,1 UA a 1,6 UA. Las soluciones que contenían diferentes inmunoglobulinas ultrafiltradas a un valor de pH de 5,0 se analizaron con respecto a la formación de partículas y la turbidez. La formación de partículas y la turbidez se redujeron claramente a dicho valor del pH. Lo anterior puede atribuirse a que el valor del pH, de 7,4, es próximo al punto isoeléctrico (PI) de uno de los anticuerpos, que se ha determinado que es de aproximadamente 8 (Nakatsuka S. y Michaels A.S., J. Membr. Sci. 69:189-211, 1992).

30 Se llevó a cabo la medición de las partículas y de la turbidez a 350 nm y la HPLC-ET, para llevar a cabo un seguimiento de la inducción de agregados debido a la adición de ácido clorhídrico. Para el producto final reajustado, se observó una inducción de partículas de tamaño superior a 1  $\mu$ m y un incremento de la turbidez para las soluciones concentradas en histidina 20 mM a pH 5,0.

35 Se determinó un incremento de los PME de  $2,23 \pm 0,05\%$  a 2,71%. Para la solución que contenía histidina 29,6 mM a pH 5,0 antes de la UF, el número de partículas por cada ml mayor que 1  $\mu$ m, los valores de turbidez y el porcentaje de PME permaneció constante.

40 Tras reajustar el valor del pH de 7,4 a 5,0, el porcentaje de PME se incrementó de 0,74% a  $17,15 \pm 0,97\%$ . Concomitantemente, el número de partículas mayores de 1  $\mu$ m y los valores de turbidez se redujeron. Sin embargo, el número de partículas y los valores de turbidez se mantuvieron mucho más altos en comparación con los otros dos procedimientos.

45 Se ha observado que la adición de un HCl de molaridad más alta incrementa el porcentaje de dímeros, así como el de oligómeros. Lo anterior se previno mediante la adición de HCl 0,02 M. Concomitantemente, la adición de un HCl diluido resultó en una dilución masiva de la masa concentrada de proteínas, resultando finalmente en aproximadamente un tercio de la concentración de proteínas tras el ajuste del pH.

50 Se ha encontrado además que un cambio del pH antes del procedimiento de filtración tangencial resulta una reducción del flujo transmembranal que resulta en un tiempo de concentración drásticamente incrementado (ver la figura 8). En el caso de que se lleve a cabo una corrección de la concentración de soluto antes de la UF, no se produce ninguna reducción del flujo transmembranal y el tiempo de concentración no resulta afectado.

55 Se observó que el flujo de filtrado se reducía significativamente durante el procesamiento en comparación con los experimentos realizados a pH 5,0. El tiempo del procedimiento se más que duplicó, de  $120 \pm 2$  min. a  $300 \pm 2$  min. al ajustar el valor del pH a 7,4 antes de iniciar la UF. También se observó que la adición de histidina antes de la etapa de UF no presentaba ninguna influencia sobre el flujo de filtrado.

Se encontró además que con la composición de tampón alterada durante el procedimiento de filtración de flujo tangencial, resultaba afectada la estabilidad de la proteína concentrada.

Se llevaron a cabo procedimientos de UF durante el procedimiento y el desarrollo de la formulación. Se aplicaron diferentes sistemas de UF, materiales de membrana y parámetros operativos para concentrar el volumen principal de proteínas. Con el objetivo de alcanzar una prueba de que el modelo presentado en la presente memoria reflejaba adecuadamente los valores experimentales respecto a la pérdida de histidina durante la concentración mediante UF, se sometieron a ensayo diferentes materiales de membrana, sistemas de UF y parámetros operativos (ver la Tabla 3 y la figura 5).

Tabla 3: diferentes configuraciones.

Concentración de histidina [mM]	Valor de pH	Material de membrana de UF / tamaño de poro [kDa]	Sistema de UF	$\Delta p$ [bar]
20	5,0	RC / 30	Celda bajo agitación	2,0
20	5,0	RC / 30	Flujo cruzado	0,8
20	5,0	RC / 30	Flujo cruzado	1,5
20	5,0	PES / 30	Flujo cruzado	1,5

Especialmente la polietersulfona (PES) es conocida que adsorbe proteínas en mayor grado que la celulosa regenerada (CR), debido a su hidrofobicidad incrementada. Además, las proteínas y los solutos pueden interactuar con la superficie de la membrana basándose en interacciones de carga-carga. En consecuencia, el resultado de la molaridad del soluto en los concentrados puede resultar influida por la elección de material de membrana.

Con independencia del sistema de UF aplicado, del material de la membrana o de las condiciones operativas, los datos experimentales referentes a la molaridad de la histidina durante la UF puede aproximarse mediante la utilización de las ecuaciones indicadas anteriormente.

En la figura 10, se muestra un gráfico que muestra la concentración de la histidina que debe ajustarse antes de la ultrafiltración dependiendo de la concentración final deseada de proteína con el fin de presentar una solución final con tampón de histidina 20 mM a pH 5,5, ejemplificado con un anticuerpo anti-A $\beta$ , calculada según el método informado en la presente memoria.

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

#### Descripción de las figuras

Figura 1 Concentración de iones de tampón antes y después de la filtración de flujo tangencial ejemplificadas con un tampón de histidina y un tampón de acetato, ejemplificado con un anticuerpo anti-A $\beta$ ; negro=tampón de histidina; blanco=tampón de acetato.

Figura 2 Concentraciones de iones de tampón antes y después de la filtración de flujo tangencial, ejemplificada con un tampón de histidina y un tampón de acetato antes del ajuste del valor de pH a un valor próximo al punto isoeléctrico antes de la filtración de flujo tangencial; negro=tampón de histidina 20 mM, pH 5; blanco=tampón de histidina, 20 mM, pH 7,5.

Figura 3 Curso de las concentraciones de ión del tampón durante la filtración de flujo tangencial ejemplificado con un tampón de histidina y un tampón de acetato con ajuste de la concentración de iones de tampón antes de la filtración de flujo tangencial; rombos pequeños: datos experimentales de tampón de histidina 20 mM, línea continua: ajuste para los presentes datos; rombos grandes: datos experimentales de tampón de histidina 29,6 mM, línea discontinua: ajuste de los presentes datos.

Figura 4 Concentraciones de iones de tampón antes y después de la filtración de flujo tangencial, ejemplificada con un tampón de histidina y un tampón de acetato con ajuste de la concentración de iones de tampón antes de la filtración de flujo tangencial; negro=tampón de histidina 20 mM; blanco=tampón de histidina, 29,6 mM.

Figura 5 Cambio de la concentración de iones de tampón en un procedimiento de concentración con diferentes dispositivos de concentración; línea continua: ajuste; triángulos blancos: Hydrosart<sup>TM</sup>; triángulos grises: celda de agitación; triángulos pequeños negros: PESU; triángulos grandes negros:  $\Delta P=0,8$  bar.

Figura 6 Inducción de compuestos de elevado peso molecular durante la concentración debido al ajuste del pH; negro=concentrado a pH 5,0; gris claro=concentrado a pH 7,5; gris oscuro=concentrado a pH 5 y adición de histidina adicional antes de la concentración.

Figura 7 Inducción de partículas durante la concentración debido al ajuste del pH; negro=concentrado a pH 5,0; gris claro=concentrado a pH 7,5; gris oscuro=concentrado a pH 5 y adición de histidina adicional antes de la concentración.

5 Figura 8 Dependencia del flujo transmembrana respecto de la concentración de retenido y del método de ajuste; rombos pequeños blancos=pH 7,5; rombos grises=pH 5,0 con una P de 0,8 bar; rombos negros=pH 5,0 PESU; rombos grandes blancos=pH 5,0 Hydrosart™; triángulos negros=pH 5,0 con adición de histidinas antes de la concentración.

Figura 9 Potencial zeta determinado según el Ejemplo 13 para un anticuerpo anti-IL-1R.

10 Figura 10 Gráfico que muestra la concentración histidina que debe ajustarse antes de la ultrafiltración según la concentración final de proteína deseada con el fin de obtener una solución final con tampón de histidina 20 mM a pH 5,5 ejemplificada con un anticuerpo anti-Aβ.

### Ejemplo 1

#### 15 Materiales y métodos

##### Compuestos químicos

20 Todos los compuestos químicos y reactivos utilizados eran de por lo menos grado analítico. El ácido clorhídrico y el hidróxido sódico se obtuvieron de Merck KG (Darmstadt, Alemania). Se utilizó L-histidina de Ajinomoto (Raleigh, EUA). El ácido se obtuvo de Fluka (Steinheim, Alemania). El cloruro sódico se obtuvo de Merck KG (Darmstadt, Alemania).

##### Anticuerpo

25 El método tal como se informa en la presente memoria se ejemplifica con una inmunoglobulina contra el péptido β-amiloide (anticuerpo anti-Aβ), tal como se informa en los documentos n° WO 2003/070760 o n° US 2005/0169925.

30 Otra inmunoglobulina ejemplar es un anticuerpo anti-selectina P tal como se informa en el documento n° WO 2005/100402 o en n° US 2005/0226876.

### Ejemplo 2

#### Preparación de muestras

35 Se utilizó una solución de la inmunoglobulina en tampón de histidina 20 mM a pH 5,5 y a una concentración de 50 mg/ml para los experimentos de concentración en tampón de histidina. Con el fin de obtener material que contuviese una molaridad más alta de histidina, se añadió base histidina a la solución de proteína y se ajustó el pH a 5,5 mediante la adición de ácido clorhídrico 0,1 M.

40 Con el fin de obtener soluciones que contienen tampón de acetato 20 mM y 45 mM, pH 5,0, respectivamente, el material de histidina 20 mM se diafiltró frente al volumen 10 veces mayor de tampón de acetato sódico, pH 5,0, mediante la utilización de FFT.

45 Se utilizó una solución de la inmunoglobulina en tampón de histidina 20 mM a pH 5,0 y a una concentración de 20 mg/ml para los experimentos en tampón de histidina.

50 Antes del procesamiento de ultrafiltración (UF), las soluciones se diluyeron a una concentración de proteína de 10 mg/ml mediante la utilización del tampón correspondiente y se filtraron a través de un cartucho de membrana de 0,22 μm (Sartorius, Göttingen, Alemania).

### Ejemplo 3

#### Filtración de flujo tangencial

55 Para la preparación de soluciones concentradas de inmunoglobulina, se utilizó el sistema automático de filtración de flujo tangencial (FFT) ÅKTAcrossflow™ (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Se utilizó el método tal como se informa en el documento n° WO 2009/010269 para todos los experimentos.

60 Brevemente, se seleccionó un caudal de retenido de 240 l/m<sup>2</sup>/h y una PTM de 1,25 bar como las condiciones al inicio del procedimiento de UF para una concentración de inmunoglobulina de entre 5 mg/ml y 25 mg/ml. De 25 mg/ml a 50 mg/ml, se redujo la PTM a 0,85 bar. Además, el caudal del retenido se incrementó a 450 l/m<sup>2</sup>/h, llevando el flujo

de filtrado de 30 hasta 45 l/m<sup>2</sup>/h. Para un intervalo de concentración de entre 50 mg/ml y hasta la concentración diana, de 140 mg/ml o superior, se fijó una PTM de 0,85 bar y un caudal de retenido incrementado de 390 l/m<sup>2</sup>/h.

5 Se utilizó un cartucho de lámina plana para Sartoclon Slice con una membrana Hydrosart™ de celulosa regenerada, con un corte nominal de peso molecular (CNPM) de 30 kDa y un área de membrana de 0,02 m<sup>2</sup> (Sartorius, Göttingen, Alemania). La carga total de membrana era de aproximadamente 400 g/m<sup>2</sup> para cada experimento. Tras la concentración, se lavó el módulo de membrana con hidróxido sódico 1 M. Se determinó la tasa de flujo normalizada para agua (FAN) tras cada ciclo de lavado y se comparó con el valor obtenido antes del uso inicial. El  
10 cartucho sólo se aplicó para los experimentos siguientes en el caso de que la caída del FAN en (1/m<sup>2</sup>/h)/l bar a 20°C fuese inferior a 10% del valor inicial a fin de garantizar un lavado completo y propiedades de membrana comparables.

#### Ejemplo 4

##### 15 Determinación de la concentración

Se determinó la concentración de inmunoglobulina mediante la utilización de la absorbancia fotométrica a 280 nm y 320 nm tras la resta del blanco de tampón (espectrofotómetro de UV-Vis Evolution 500, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Se restó la absorbancia a 320 nm de la absorbancia a 280 nm y este valor de absorbancia se utilizó  
20 para calcular el contenido de proteína según la ley de Lambert-Beer.

#### Ejemplo 5

##### 25 Seguimiento de la conductividad y del pH

Durante el procedimiento de FFT cada vez que se duplicaba la concentración se extraía 1 ml del retenido Se determinó el pH mediante la utilización del pH-metro del microprocesador pH 196 dotado de una celda medidora de un solo soporte del pH E50-1.5 de WTW (Weilheim, Alemania). Se determinó la conductividad mediante la utilización del conductímetro ProfiLine LF 197 dotado de una celda de conductividad estándar TetraCon 325 de WTW  
30 (Weilheim, Alemania). Todas las muestras se templaron en un baño de agua a 25°C antes de medir el pH y la conductividad.

#### Ejemplo 6

##### 35 Cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño

Se llevaron a cabo experimentos de cromatografía líquida de alto rendimiento-exclusión por tamaño (HPLC-ET) con una columna TSK 3000 SWXL (Tosoh Bioseparation GmbH, Stuttgart, Alemania) en un sistema de HPLC Summit (Dionex, Idstein, Alemania). Se realizó un seguimiento de los picos de elución a 280 nm con el detector de matriz de diodos de UV UVD170U de Dionex (Idstein, Alemania). Se llevó a cabo una cromatografía isocrática a temperatura ambiente utilizando un tampón acuoso compuesto de fosfato potásico 200 mM y cloruro potásico 250 mM a pH 7,0 y a un caudal de 0,5 ml/min. Cada muestra contenía 100 mg de carga de inmunoglobulina en cada inyección. Los  
40 cromatogramas se integraron manualmente mediante la utilización del software Chromeleon (Dionex, Idstein, Alemania). El porcentaje de especies de peso molecular elevado (PME), incluyendo los dímeros y oligómeros solubles de mayor tamaño, se determinó como área relativa (mUA\*min.) referido al área total de los dos picos de PME, el pico de monómero y el pico de especies de peso molecular bajo (PMB).

#### Ejemplo 7

##### 50 Ensayo de histidina

Por cada duplicación de la concentración de proteína en el retenido se determinó la concentración de histidina. Las muestras se diluyeron a aproximadamente 100 µM de concentración de histidina con agua purificada (Milli-Q, Millipore, Billerica, EUA). A continuación, se mezclaron 500 µl de muestra diluida con 500 µl de ácido perclórico (al 5%) (Fluka, Steinheim, Alemania). Tras 10 min., la muestra se centrifugó a 25°C con 13.000 rpm durante 10 min. (minSpin, Eppendorf, Hamburg, Alemania). Se inyectaron 100 µl del sobrenadante en una columna MonoS 5/50 GL CEX (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Se llevaron a cabo cromatografías en un sistema de HPLC Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Alemania) a temperatura ambiente utilizando una elución en gradiente aplicando dos tampones  
55 acuosos compuestos de acetato 50 mM, pH 3,2 (tampón A) y acetato 50 mM, pH 3,2, cloruro sódico 1 M (tampón B). Se aplicó un caudal de 1,0 ml/min. Se realizó un seguimiento de la elución a 210 nm. Los cromatogramas se integraron manualmente mediante la utilización del software Chromeleon (Dionex, Idstein, Alemania). Para cuantificar la cantidad de histidina, se comparó el área (mUA\*min.) del pico definido con una curva estándar (r<sup>2</sup>=0,9998).  
60

Ejemplo 8Ensayo de acetato

5 Por cada duplicación de la concentración de proteína en el retenido se determinó la concentración de acetato. Las muestras se diluyeron a aproximadamente 25 mM de concentración de acetato con agua purificada (Milli-Q, Millipore, Billerica, EUA). A continuación, se mezclaron 500 µl de muestra diluida con 500 µl de ácido perclórico (al 5%) (Fluka, Steinheim, Alemania). Tras 10 min., la muestra se centrifugó a 25°C con 13.000 rpm durante 10 min. (minSpin, Eppendorf, Hamburg, Alemania). Se inyectaron 100 µl del sobrenadante en una columna LiChrosorb RP C18 4/250 (Merck KG, Darmstadt, Alemania). Se llevaron a cabo tandas cromatográficas en un sistema de HPLC Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Alemania) a temperatura ambiente utilizando una elución isocrática durante 15 min. aplicando un tampón acuoso compuesto de ácido fosfórico 6 mM (Fluka, Steinheim, Alemania), pH 2,6 (Kordis-Krapez M. et al., Food Technol. Biotechnol. 39:93-99, 2001). Tras cada tanda de muestra, la columna se lavó con 3 ml de acetonitrilo (Merck KG, Darmstadt, Alemania) para evitar la contaminación cruzada entre muestras. Se aplicó un caudal de 1,0 ml/min. Se realizó un seguimiento de la elución a 210 nm. Los cromatogramas se integraron manualmente mediante la utilización del software Chromeleon (Dionex, Idstein, Alemania). Para cuantificar la cantidad de acetato, se comparó el área (mUA\*min) del pico definido con una curva estándar ( $r^2=0,9999$ ).

Ejemplo 9

20 Ensayo de cloro

Por cada duplicación de la concentración de proteína en el retenido se determinó la concentración de cloro. Las muestras se diluyeron 1:200 con agua purificada (Milli-Q, Millipore, Billerica, EUA). Se inyectaron 10 µl de la muestra diluida en una columna IonPac AS11-HC 2/250 (Merck KG, Darmstadt, Alemania).

25 Se llevaron a cabo tandas cromatográficas en un sistema de cromatografía iónica sin reactivos ICS 3000 (Dionex, Idstein, Alemania) a temperatura ambiente utilizando una elución en gradiente durante 30 min., aplicando una solución acuosa hasta 100 mM de hidróxido sódico. Se aplicó un caudal de 0,38 ml/min. Se llevó a cabo la detección en un detector de conductividad ICS 3000 CD. Los cromatogramas se integraron manualmente mediante la utilización del software Chromeleon (Dionex, Idstein, Alemania). Para cuantificar la cantidad de cloro, se comparó el área (mUA\*min.) del pico definido con una curva estándar ( $r^2=0,9963$ ).

Ejemplo 10

35 Ensayo de sodio

Para cuantificar la cantidad de iones sodio, se analizaron las muestras con el sistema multisensor BioProfile100plus (NOVA Biomedical, Waltham, USA). Se cuantificaron los iones sodio a 25°C tras una calibración de dos puntos. Las muestras se diluyeron 1:1 con agua purificada (Milli-Q, Millipore, Billerica, EUA) antes de la medición.

Ejemplo 11

45 Medición de la turbidez

Se determinó la turbidez como absorbancia fotométrica de los concentrados no diluidos a 350 nm y a 550 nm tras la resta del blanco de tampón, en donde no absorbe ningún cromóforo intrínseco de la inmunoglobulina monoclonal (espectrofotómetro de UV-Vis Evolution 500, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) (Capelle M.A.H. et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 65:131-148, 2007). Las muestras se mezclaron antes de la medición. En presencia de partículas suspendidas, se produce un incremento de la absorbancia de UV a todas las longitudes de onda debido a efectos de dispersión (Eberlein G.A. et al., PDA J. of Pharmac. Science and Technol. 48:224-230, 1994).

Ejemplo 12

55 Extinción de la luz

Se utilizó el oscurecimiento de la luz (OL) para monitorizar la formación de partículas en un intervalo de 1 a 200 mm de manera similar al método <788> Particulate Matter of Injection in the United States Pharmacopeia and the European Pharmacopeia method 2.9.1. (Dirección Europea para la Calidad de los Medicamentos (Ed.), Farmacopea Europea, Deutscher Apotheker Verlag/ Govi-Verlag, Stuttgart/Eschborn, 2001 a, 140-141; United States Pharmacopeia Convention (Ed.), Farmacopea estadounidense, United States Pharmacopeia Convention, Rockville, MD, 2002, 2046-2051. El contador de partículas SVSSC (PAMAS Partikelmess-und Analysesysteme, Rutesheim, Alemania) estaba equipado con un diodo láser y un detector de fotodiodos con el fin de terminar la fotocorriente

residual tras atravesar las partículas el curso del haz. Como sensor de partículas se utilizó el sensor HCB-LD-25/25. Se diluyeron con tampón los concentrados de contenido de partículas superior a 120.000/ml para ajustarse a la capacidad especificada del sensor utilizado. Se analizaron tres mediciones de un volumen de 0,5 ml de cada muestra tras un lavado equilibrador de 0,3 ml. Se calcularon los resultados como valores medios de tres mediciones y se refirieron a un volumen de muestra de 1,0 ml. Antes de diluir los concentrados se filtró el tampón utilizando dispositivos de filtración de 0,1  $\mu\text{m}$  Stericup Express plus (Millipore, Billerica, EUA) y se determinó la carga de partículas tal como se ha indicado anteriormente.

### Ejemplo 13

#### Medición del potencial zeta

Para determinar la carga de la proteína a diferentes valores del pH, se determinó la movilidad electroforética de la proteína mediante velocimetría por láser Doppler utilizando el aparato Malvern Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Se calculó el potencial zeta  $\zeta$  a partir de la ecuación de Henry bajo la premisa de distribución uniforme de cargas mediante la utilización del software Malvern DTS (versión 5.0, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido):

$$\mu_e = \frac{2 \varepsilon k \zeta}{3 \eta}$$

(ecuación 4)

en la que  $\mu_e$  es la movilidad electroforética,  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica de la solución,  $k_s$  es la constante basada en el modelo con un valor de 1,5 para concentraciones salinas superiores a 1 mM,  $\eta$  es la viscosidad de la solución y  $\zeta$  es el potencial zeta. Para la preparación de muestras, las soluciones de mAb 5 mg/ml se dializaron en un tampón acetato 50 mM, pH 5,0, y se titularon a un pH de 2,0 posteriormente mediante la utilización de ácido clorhídrico 0,2 M. Las muestras se titularon con una solución de hidróxido sódico 0,2 M de pH 2 a pH 12 mediante la aplicación del titulador MPT2 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Se determinó el potencial zeta en 15 etapas entre pH 2 y 12 en una celda capilar plegada de temperatura controlada (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) a 25°C. Se repitió cada medición tres veces y se proporcionan los valores medios  $\pm$  SD. Ver la figura 9 para una determinación ejemplar del potencial zeta de un anticuerpo anti-IL-1R.

### Ejemplo 14

#### Determinación de la densidad de la solución de proteínas

Se determinó la densidad  $\rho$  de las soluciones de proteínas en cada etapa de concentración de proteína. Un picnómetro (Schott, Mainz, Alemania) con un volumen de 2,076 ml se rellenó con una solución para muestras templada previamente a 20°C. Se determinó la masa del picnómetro sin llenar y lleno mediante la utilización de una balanza analítica (MC 210 S, Sartorius, Göttingen, Alemania). Se calculó la densidad de acuerdo con la ecuación común  $\rho = m/V$ .

## REIVINDICACIONES

1. Método para concentrar una solución de inmunoglobulinas que comprende las etapas siguientes:

- 5 a) proporcionar una solución de inmunoglobulinas con un valor de pH, con una primera concentración de proteína inmunoglobulina, y una primera concentración  $S^+$  o  $S^-$  de una sustancia tampón,  
 b) ajustar la primera concentración de la sustancia tampón a una segunda concentración  $S'$  y mantener el valor del pH, de manera que la segunda concentración  $S'$  se calcula con la ecuación 2 en el caso de que la sustancia tampón sea una pareja de catión/neutro o con la ecuación 3 en el caso de que la sustancia tampón sea una pareja de neutro/anión,  
 10 c) concentrar la solución de b) con una filtración de flujo tangencial a una segunda concentración de proteína inmunoglobulina,

en el que la ecuación 2 es:

15

$$S^+ = \frac{-zP + \sqrt{(zP)^2 + 4\left(\frac{S'}{\rho} \left(\rho - \frac{PM_p}{1000}\right)\right)^2}}{2}$$

y la ecuación 3 es:

20

$$S^- = \frac{zP + \sqrt{(zP)^2 + 4\left(\frac{S'}{\rho'} \left(\rho - \frac{PM_p}{1000}\right)\right)^2}}{2}$$

25

la concentración molar en el retenido de solutos cargados positivamente/negativamente ( $S^+/S^-$ ), la carga de la proteína ( $z$ ), la concentración molar ( $P$ ) y el peso molecular ( $P_m$ ) de la proteína, la densidad de la solución en el retenido ( $\rho$ ) y el filtrado ( $\rho'$ ), y la concentración molar teórica del soluto difundible ( $S'$ ), en donde la concentración teórica de soluto difundible  $S'$  se corrige con un factor de corrección en el que el incremento relativo de cada valor del pH se utilizó como el factor de corrección respectivo, en el que la proporción entre el anión del tampón/el catión del tampón y ácido del tampón se calcula para cada valor de pH determinado en el retenido mediante la utilización de la ecuación de Henderson-Hasselbach y se utiliza el incremento relativo a cada valor del pH como el factor de corrección respectivo.

30

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la sustancia tampón es histidina y por que la segunda concentración se calcula con la ecuación 2.

35

3. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la primera concentración es 20 mM.

4. Método según la reivindicación 3, caracterizado por que la segunda concentración es de entre 24 mM y 37 mM.

5. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la primera concentración es 46 mM.

40

6. Método según la reivindicación 5, caracterizado por que la segunda concentración es de entre 52 mM y 72 mM.

7. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la sustancia tampón es acetato y por que la concentración se calcula con la ecuación 3.

45

8. Método según la reivindicación 7, caracterizado por que la primera concentración es 20 mM.

9. Método según la reivindicación 8, caracterizado por que la segunda concentración es de entre 8 mM y 19 mM.

50

10. Método según la reivindicación 7, caracterizado por que la primera concentración es 45 mM.

11. Método según la reivindicación 10, caracterizado por que la segunda concentración es de entre 41 mM y 48 mM.

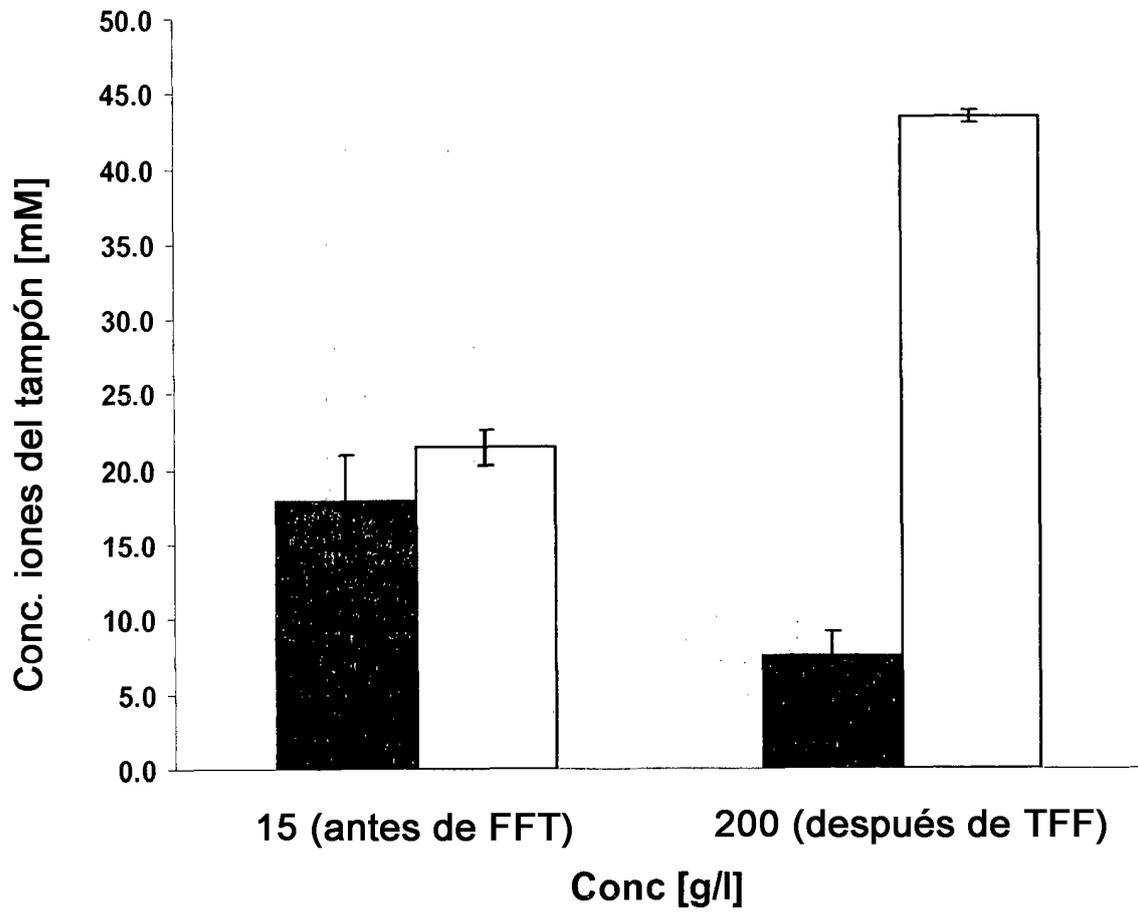
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la inmunoglobulina es un anticuerpo anti-selectina P o un anticuerpo anti-A $\beta$ .

55

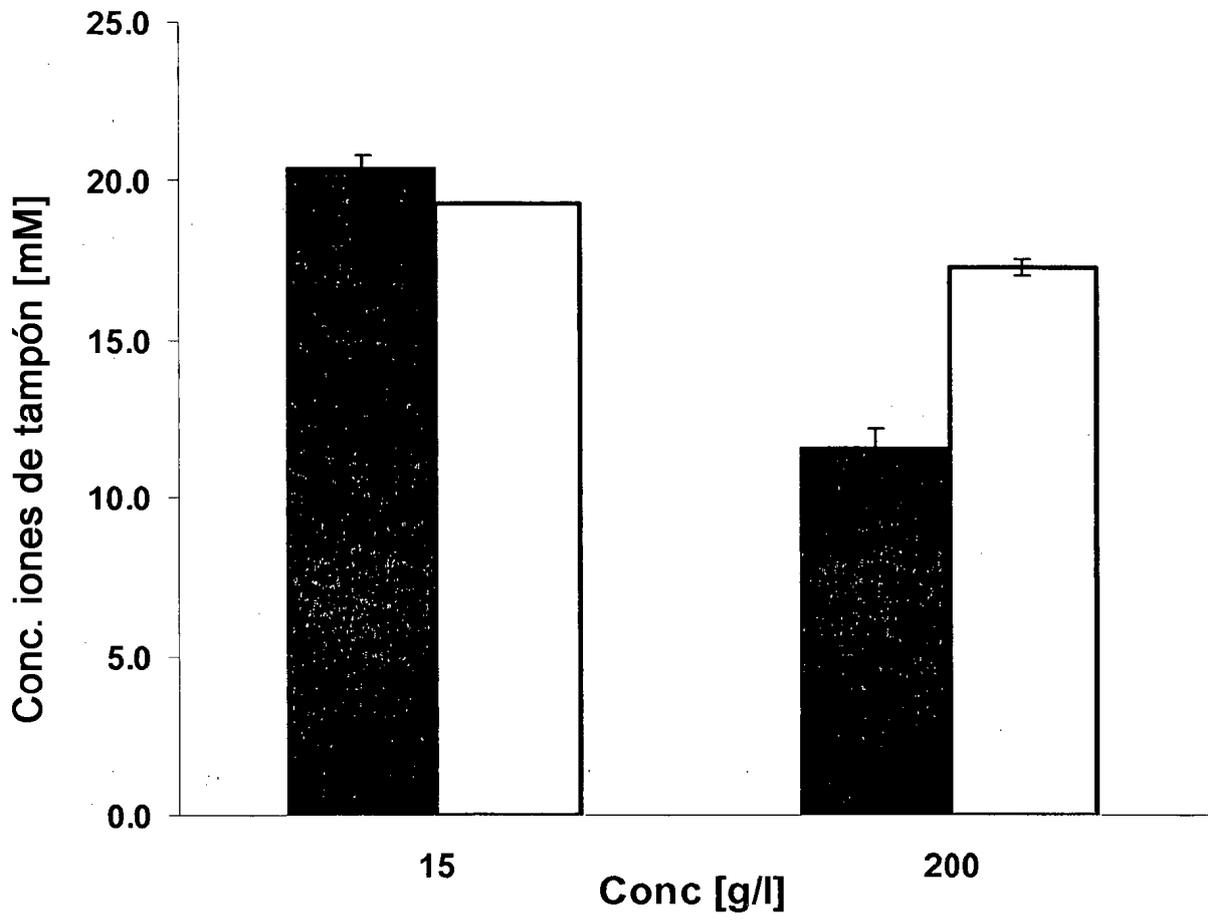
13. Método para producir una inmunoglobulina in vitro, que comprende:

- 5
- a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico codificante de la inmunoglobulina,
  - b) recuperar la inmunoglobulina a partir del medio de cultivo o la célula de la etapa a),
  - c) purificar la inmunoglobulina,
  - d) concentrar la inmunoglobulina con un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y de esta manera producir una inmunoglobulina.

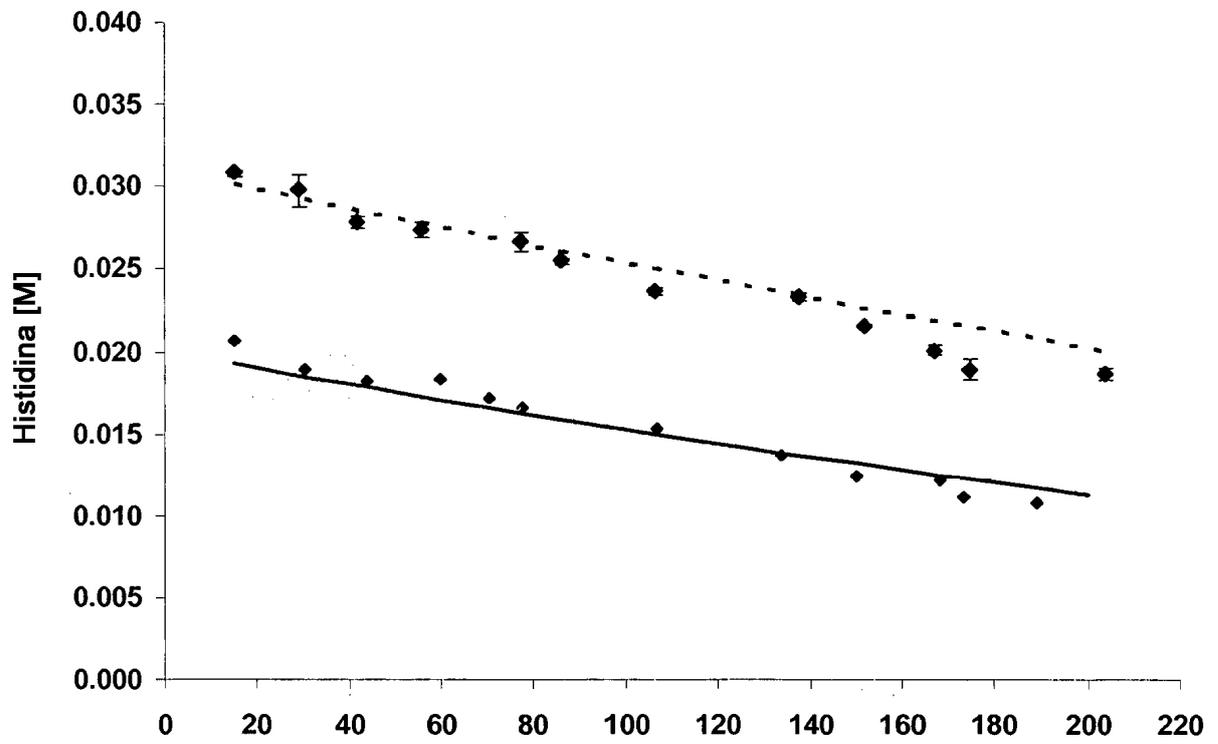
**Fig. 1**



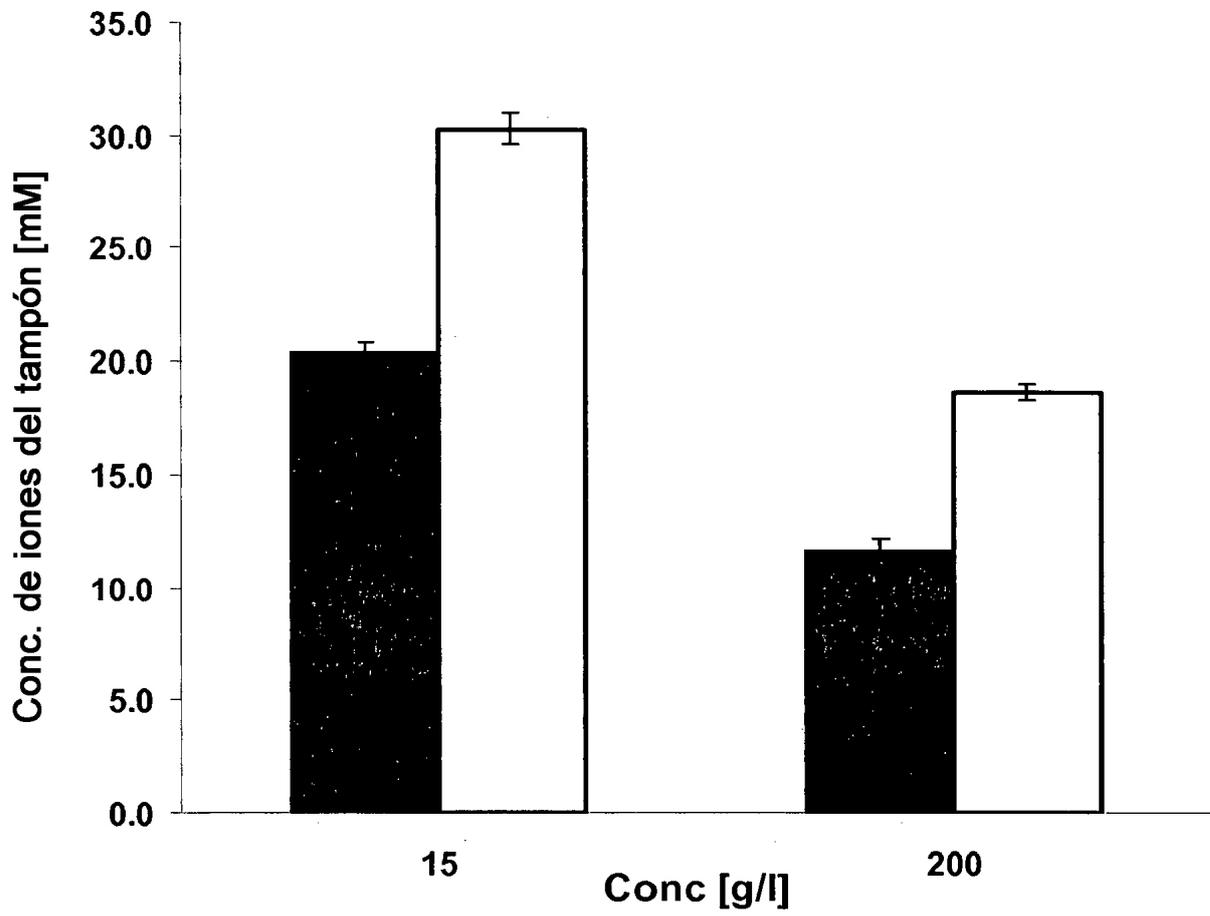
**Fig. 2**



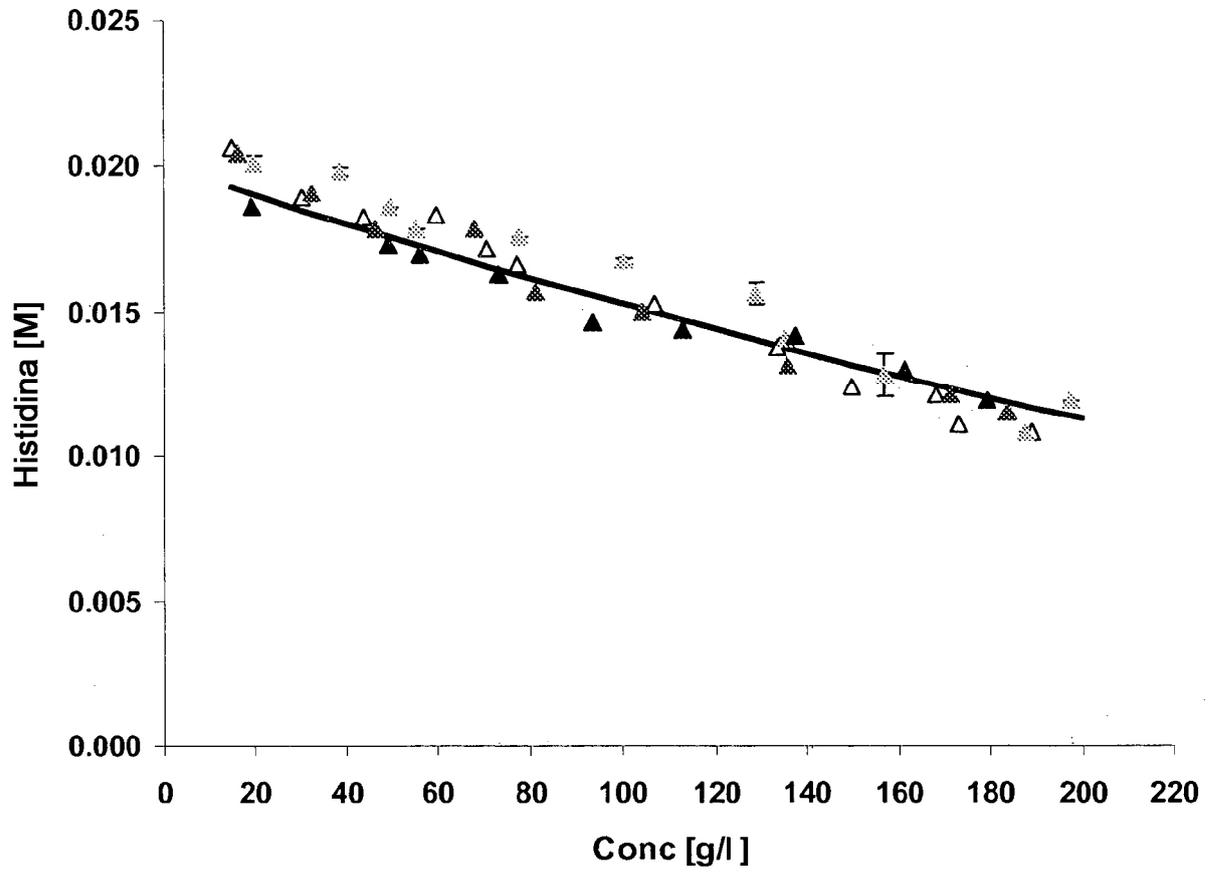
**Fig. 3**



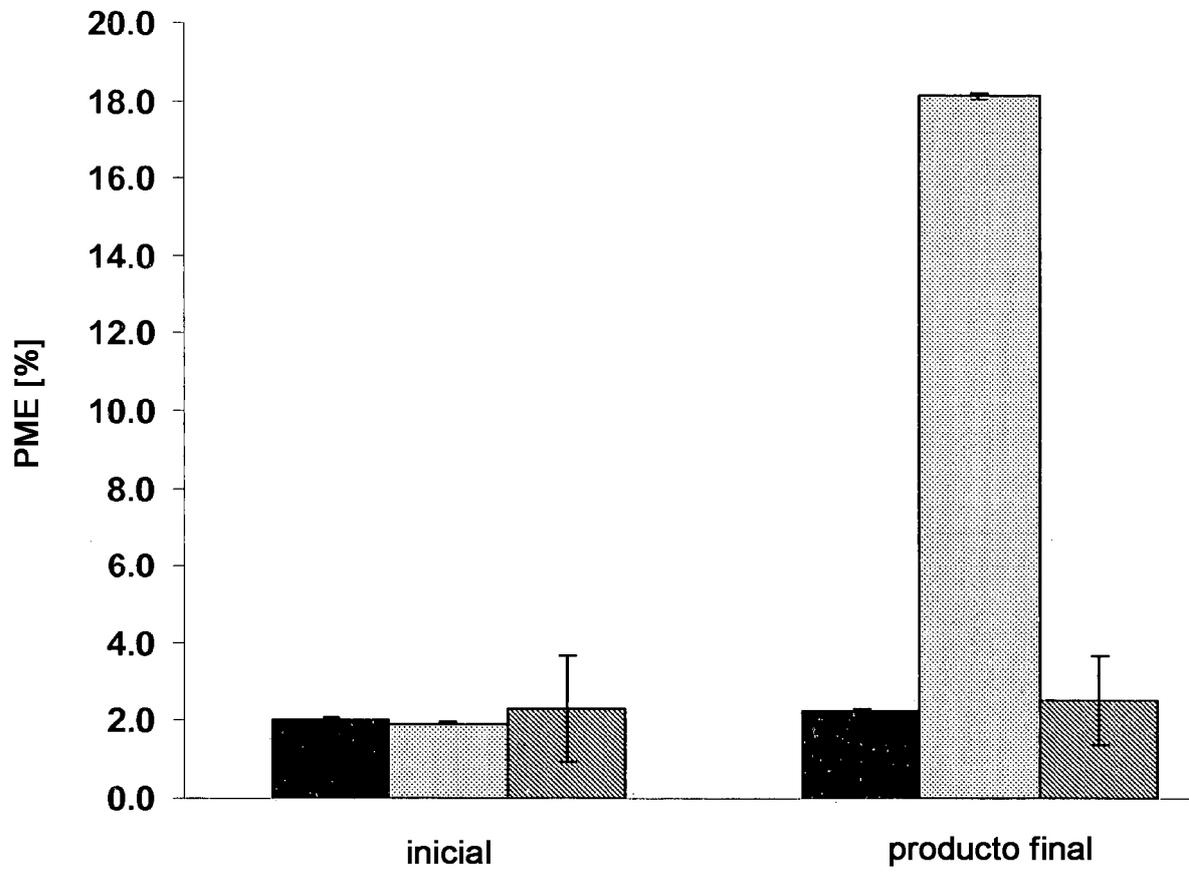
**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**

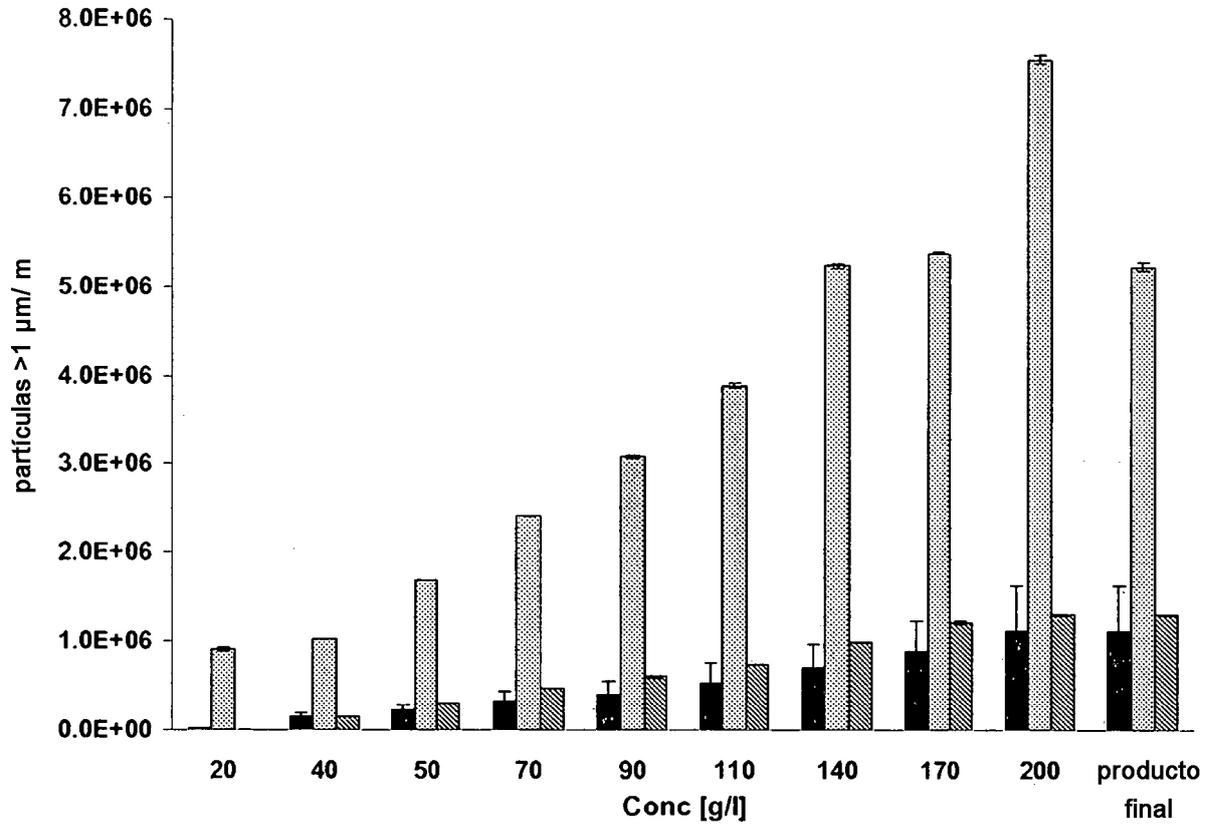
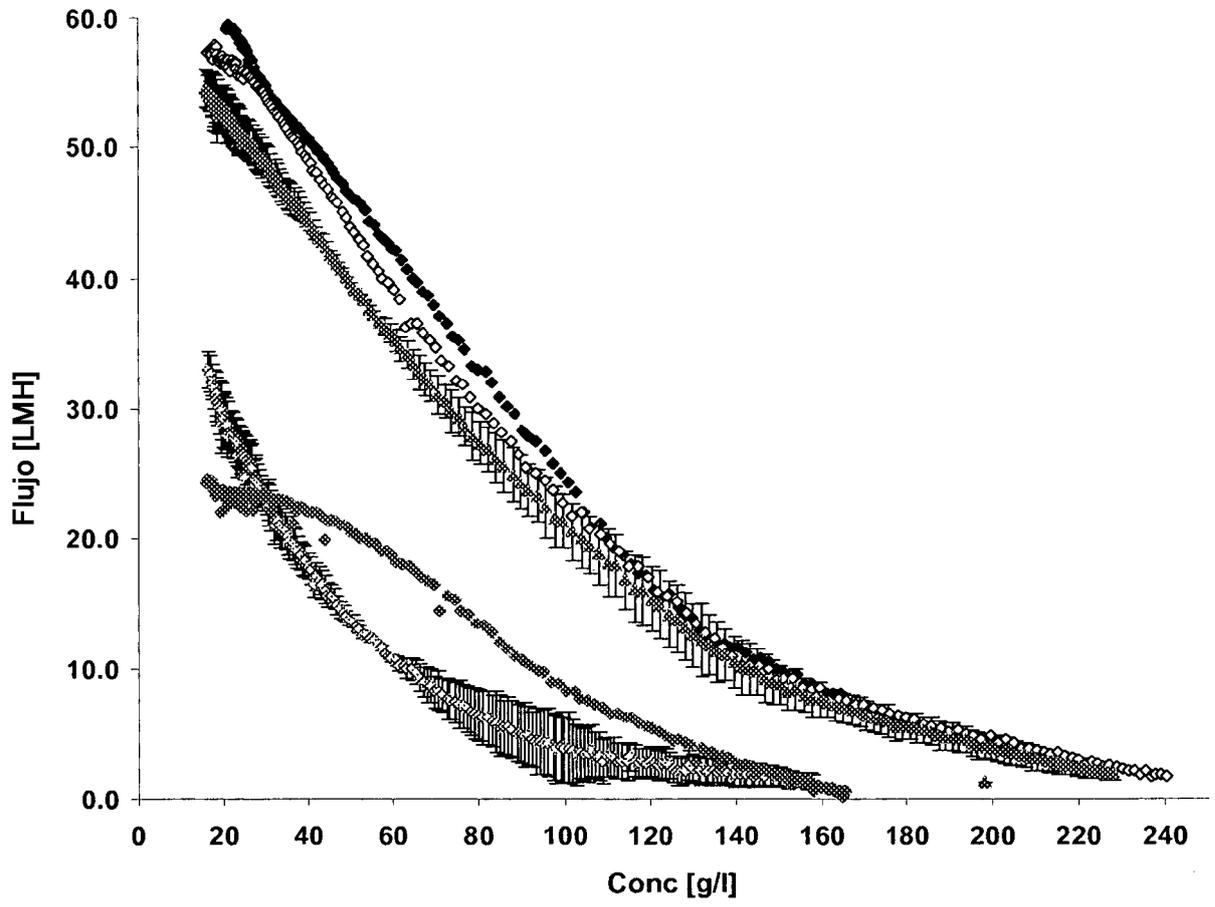
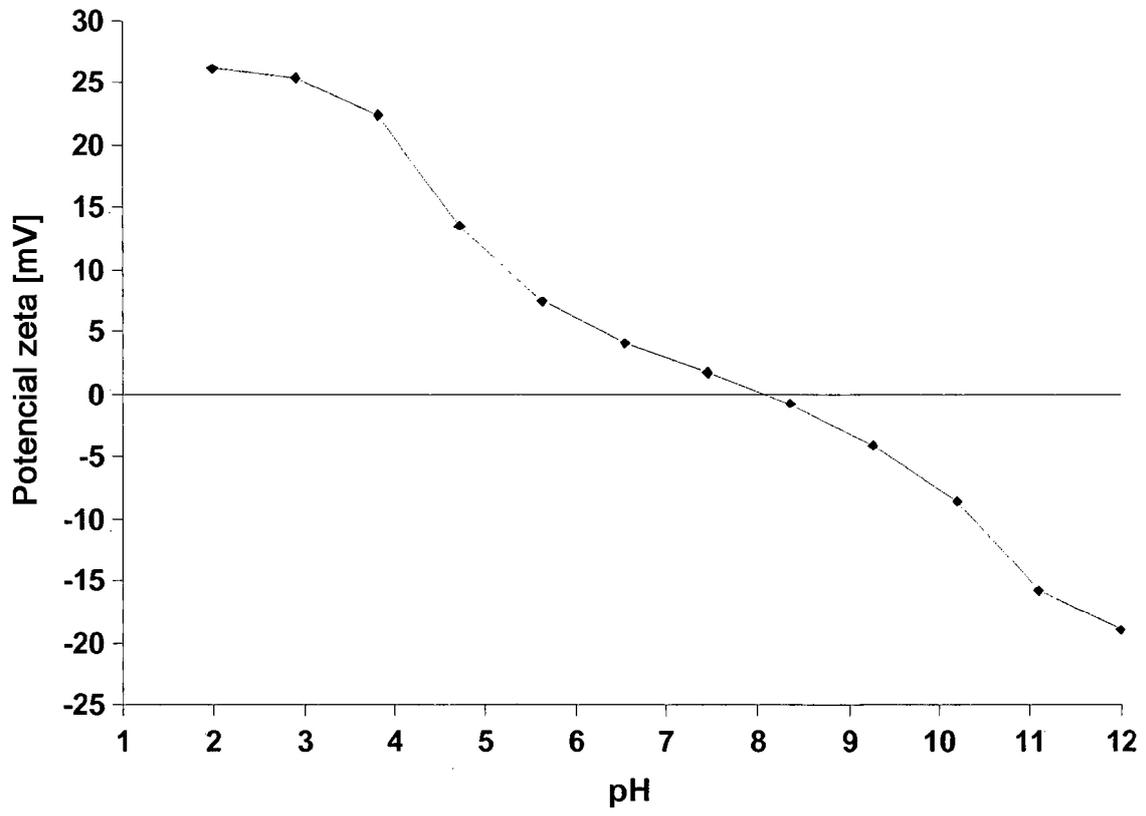


Fig. 8



**Fig. 9**



**Fig. 10**

