

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 103**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/06** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2010 PCT/EP2010/064487**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO11039274**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2010 E 10757795 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2483305**

54 Título: **Filtración final de una preparación de inmunoglobulina en múltiples pasos**

30 Prioridad:

**01.10.2009 EP 09012460**

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

**03.03.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FALKENSTEIN, ROBERTO y  
SCHWENDNER, KLAUS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 604 103 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Filtración final de una preparación de inmunoglobulina en múltiples pasos

5 En la presente se describe un método para la filtración final de soluciones de polipéptidos concentrados que comprende la combinación de dos etapas de filtración inmediatamente consecutivas siendo la primera etapa una etapa de filtración con una prefiltración con un filtro con un tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$  y una filtración principal con un filtro con un tamaño de poro de 0,8  $\mu\text{m}$  y una segunda filtración con una prefiltración con un filtro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y con una filtración principal con un filtro con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

10 Antecedentes de la invención

15 Las soluciones de proteína con una concentración de más de 100 g/l son propensas a presentar dificultades durante la etapa de filtración final, por ejemplo, por tener sólo flujos transmembrana bajos o por el bloqueo del filtro empleado por agregados o partículas formadas durante el proceso de formulación o concentración o debido a excipientes añadidos dando como resultado una viscosidad aumentada de la solución concentrada.

20 La combinación de alta viscosidad y aumento del contenido de partículas o contenido de agregado da como resultado a menudo el bloqueo de los poros de un filtro empleado de filtración final de 0,22  $\mu\text{m}$ . Como consecuencia, o bien el filtro tiene que ser reemplazado durante la etapa de filtración, es decir, antes de que el lote se procese completamente, o se tiene que usar una superficie de filtro aumentada.

25 Además, se ha observado que una combinación de un filtro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y un filtro con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  no tiene ventajas, por ejemplo, con el filtro Sartobran P 0,45/0,22  $\mu\text{m}$ . Los filtros con un mayor tamaño de poro que probablemente eludan los problemas anteriormente descritos se emplean como filtros de profundidad o prefiltros, pero no como filtros finales.

30 En el documento DE 4 204 444 se describe una combinación de un prefiltro de 1,2  $\mu\text{m}$  para eliminar gotas de agua de una corriente de gas antes de una filtración estéril de 0,2  $\mu\text{m}$ . En el documento US 4.488.961 se describe una unidad de filtro que comprende dos filtros de diferente tamaño de poro, en el que el filtro de tamaño de poro más pequeño es flexible permitiendo que el filtro se doble y así cambiar la dirección de flujo del filtro para reducir la resistencia de la unidad de filtro. En el documento US 5.643.566 se describe una combinación de una prefiltración con un filtro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y una filtración estéril con un filtro de un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . En el documento PE 0 204 836 se describe un filtro de dos etapas construido usando una membrana con un interior liso con una membrana porosa delgada y flexible soportada por un soporte de pantalla rígido con un tubo expansor acanalado. En el documento DE 3 818 860 se describe una combinación de al menos dos unidades de filtro de membrana de diferente material de membrana y diferentes tamaños de poro de filtro y geometrías de poro de filtro.

40 Aldington et al. (J. Chrom. B 848 (2007) 64-78) describen un escalaje de los procesos de purificación de anticuerpos monoclonales. En el documento CS 247484 se describe un método para preparar inmunoglobulina contra linfocitos humanos.

Resumen de la invención

45 Se ha encontrado que se puede usar una combinación de dos filtros que comprenden cada uno un prefiltro y un filtro principal y cada uno con un tamaño de poro específicamente seleccionado para filtrar soluciones de inmunoglobulina altamente concentradas durante la etapa final de envasado sin el riesgo del bloqueo de poros y la necesidad de reemplazar el filtro durante el proceso de filtración.

50 Un aspecto de la presente invención es un método para la preparación de una solución de inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una solución de inmunoglobulina con una concentración de proteína de al menos 100 g/l;  
 b) filtrar la solución de inmunoglobulina a través de una combinación de un primer y un segundo filtro, con lo que  
 55 el primer filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,8  $\mu\text{m}$  y el segundo filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , y de este modo preparar una solución de inmunoglobulina.

60 Otro aspecto como se describe aquí es el uso de una combinación de filtros como se describe aquí de una combinación de un primer y un segundo filtro, por lo que el primer filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,8  $\mu\text{m}$  y el segundo filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  para la filtración final de una solución de inmunoglobulina antes de la preparación del ingrediente farmacéutico activo.

Otro aspecto como se describe aquí es un método para producir una inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina,
- b) cultivar la célula,
- c) recuperar la inmunoglobulina de la célula o el medio de cultivo,
- d) purificar la inmunoglobulina con una o más etapas de cromatografía y proporcionar una solución de inmunoglobulina, y
- e) filtrar la solución de inmunoglobulina de la etapa d) a través de una combinación de un primer y segundo filtro, por lo que el primer filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,8  $\mu\text{m}$  y el segundo filtro comprende un pre-filtro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  y produciendo así un filtro Inmunoglobulina.

Se describe adicionalmente en este documento un equipo que comprende un primer filtro que comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,8  $\mu\text{m}$  y el segundo filtro que comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

En una realización, el primer filtro tiene un área que es como máximo el doble del área del segundo filtro. En otra realización, el primer y el segundo filtro tienen aproximadamente el mismo área de filtro total. En una realización, la solución de inmunoglobulina comprende un azúcar, y/o un aminoácido, y/o un tensioactivo, y/o una sal. En una realización adicional, la solución de inmunoglobulina tiene una concentración entre 100 g/l y 300 g/l. En aún otra realización, la solución de inmunoglobulina tiene un volumen entre 3 litros y 100 litros. En una realización adicional, la filtración se realiza con una presión aplicada entre 0,1 bar y 4,0 bar. En una realización, la solución de inmunoglobulina tiene una concentración de 160 g/l o más y la filtración es con una presión aplicada de 1,45 bares o más. En una realización adicional es de 1,50 bares o más. En otra realización, la solución de inmunoglobulina comprende un azúcar y un tensioactivo y tiene una concentración de 125 mg/ml o más y la filtración se realiza con una presión aplicada de 0,75 bar o menos. En una realización adicional es de 0,7 bar o menos.

En una realización, la inmunoglobulina es un anticuerpo anti-receptor IL13 alfa o un anticuerpo anti-HER2. En una realización adicional, la purificación se realiza con una etapa de cromatografía de afinidad de proteína A y al menos una etapa seleccionada de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrófoba.

Descripción detallada de la invención

Se ha encontrado que una combinación de dos filtros o unidades de filtro que comprenden cada uno un prefiltro y un filtro principal y cada uno con un tamaño de poro específicamente seleccionado puede usarse para filtrar inmunoglobulina altamente concentrada y viscosa, así como soluciones formuladas de inmunoglobulina, es decir, que comprende un azúcar y un tensioactivo, durante la etapa final de envasado. Especialmente la combinación de un primer filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro entre 3,0  $\mu\text{m}$  y 0,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente, y un segundo filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro entre 0,45  $\mu\text{m}$  y 0,22  $\mu\text{m}$ , respectivamente, es altamente ventajoso. Con una única unidad de filtro de esta combinación ha sido posible filtrar soluciones altamente concentradas que contienen en total, por ejemplo, 1 kg de un anticuerpo anti-IL-13Ra1 o 6 kg de un anticuerpo anti-HER2 y para empaquetar estas cantidades sólo con pequeñas pérdidas de sustancia. En una realización, se ha determinado una relación entre el área superficial del filtro y el volumen de la solución.

En una realización, la solución de inmunoglobulina comprende la inmunoglobulina y un excipiente. En otra realización, el excipiente comprende una o más sustancias seleccionadas de azúcares, tales como glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa y rafinosa, aminoácidos, tales como arginina, lisina, histidina, ornitina, isoleucina, leucina, alanina, ácido glutámico, Las sales, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, citrato de sodio, citrato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio y tensioactivos, tales como polisorbatos y polímeros de poli (oxietileno-polioxipropileno).

La filtración según se describe aquí se usa como la etapa de filtración final en la producción de un anticuerpo terapéutico. Puede llevarse a cabo después de que se hayan añadido los excipientes, estabilizantes y/o antioxidantes necesarios a la solución de anticuerpo altamente concentrada. En una realización, la relación de la cantidad de anticuerpo en kg respecto a la superficie total del filtro es de 1000 g/m<sup>2</sup> a 10.000 g/m<sup>2</sup>. En otra realización, la proporción es de 1000 g/m<sup>2</sup> a 6000 g/m<sup>2</sup>. En otra realización más, la relación es de 4000 g/m<sup>2</sup> a 6000 g/m<sup>2</sup>.

Un "polipéptido" es un polímero que consiste en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sea producidos de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos pueden denominarse "péptidos", mientras que las moléculas que consisten en dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos de aminoácidos pueden denominarse "proteína". Un polipéptido también puede

comprender componentes no aminoácidos, tales como grupos carbohidrato, iones metálicos o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes no aminoácidos pueden ser añadidos por la célula, en la que el polipéptido se expresa, y puede variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en términos de su estructura de esqueleto de aminoácido o el ácido nucleico que la codifica. Las adiciones tales como grupos de carbohidratos generalmente no se especifican, pero pueden estar presentes.

El término inmunoglobulina se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los diferentes genes de la región constante así como los genes de la región variable de la inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en una variedad de formatos, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como cadenas simples (scFv) o diacuerpos.

El término "inmunoglobulina completa" designa una inmunoglobulina que comprende dos polipéptidos de cadena ligera de inmunoglobulina (cadena ligera) y dos polipéptidos de cadena de inmunoglobulina (cadena pesada). Cada uno de los polipéptidos de cadena inmunoglobulina pesada y ligera de una inmunoglobulina completa contiene un dominio variable (región variable) (generalmente la porción amino terminal de la cadena polipeptídica) que comprende regiones de unión que son capaces de interactuar con un antígeno. Cada uno de los polipéptidos de cadena de inmunoglobulina pesada y ligera de una inmunoglobulina completa también comprenden una región constante (generalmente la porción carboxilo terminal). La región constante de la cadena pesada media la unión del anticuerpo i) a células que llevan un receptor gamma Fc (Fc $\gamma$ R), tales como células fagocíticas, o ii) a células que portan el receptor Fc neonatal (FcRn) también conocido como receptor Brambell. También media la unión a algunos factores incluyendo factores del sistema clásico del complemento como el componente (C1q). El dominio variable de la cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina a su vez comprende segmentos diferentes, es decir, cuatro regiones marco (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).

El término fragmento de inmunoglobulina denota un polipéptido que comprende al menos un dominio del dominio variable de una cadena pesada, el dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2, el dominio CH3, el dominio CH4 de una cadena pesada, el dominio variable de una cadena ligera y/o el dominio CL de una cadena ligera. También se incluyen derivados y variantes de los mismos. Por ejemplo, puede estar presentes un dominio variable, en el que uno o más aminoácidos o regiones de aminoácidos están suprimidos.

El término "conjugado de inmunoglobulina" indica un polipéptido que comprende al menos un dominio de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina conjugada a través de un enlace peptídico a otro polipéptido. El polipéptido adicional es un péptido no inmunoglobulina, como una hormona, o un receptor de crecimiento, o péptido antifusogénico, o factor de complemento, o similar.

El término "filtro" designa tanto un filtro microporoso como uno macroporoso. El filtro comprende una membrana de filtro que está compuesta por un material polimérico tal como, por ejemplo, polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno y acetato de vinilo, politetrafluoroetileno, policarbonato, cloruro de polivinilo, poliamidas (nylon, por ejemplo Zetapore™, N<sub>66</sub> Posidyne™), poliésteres, acetato de celulosa, celulosa regenerada, compuestos de celulosa, polisulfonas, polietersulfonas, poliarilsulfonas, polifenilosulfonas, poliacrilonitrilo, fluoruro de polivinilideno, telas no tejidas y tejidas (por ejemplo Tyvek®), material fibroso, o de material inorgánico tal como zeolita, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> o hidroxipatita. En una realización, la membrana de filtro del primer y segundo filtro está hecha de acetato de celulosa.

Para la purificación de inmunoglobulinas producidas de forma recombinante a menudo se emplea una combinación de diferentes etapas de cromatografía en columna. Generalmente, una cromatografía de afinidad de proteína A es seguida por una o dos etapas de separación adicionales. La etapa de purificación final se denomina "etapa de pulido" para la eliminación de trazas de impurezas y contaminantes como inmunoglobulinas agregadas, HCP residual (proteína de la célula huésped), DNA (ácido nucleico de la célula huésped), virus o endotoxinas. Para este paso de pulido a menudo se utiliza un material de intercambio aniónico en un modo de flujo continuo.

Diferentes métodos están bien establecidos y ampliamente utilizados para la recuperación y purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminometilo) e intercambio de modo mixto), adsorción tiofilica (por ejemplo con beta-mercaptoetanol y otros ligandos de SH), interacción hidrofóbica o cromatografía de adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-sefarosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad con quelato de metal (por ejemplo, con material de afinidad con Ni(II) y Cu (II)), cromatografía de exclusión por tamaños y métodos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93 - 102).

Un primer aspecto como se describe aquí es un método para la preparación de una solución de inmunoglobulina que comprende:

- proporcionar una solución de inmunoglobulina con una concentración de proteína de al menos 100 g/l,

- filtrar la solución de inmunoglobulina a través de una combinación de una primera y segunda unidad de filtro, en el que el primer filtro comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$  y 0,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente, y la segunda unidad de filtro comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y 0,22  $\mu\text{m}$ , respectivamente, aplicando la solución a la combinación de filtros y aplicando presión y preparando de este modo una solución de inmunoglobulina.

En una realización, la concentración de proteína es de 100 g/l a 300 g/l. En otra realización, la concentración de proteína es de 100 g/l hasta 200 g/l. En una realización adicional, la concentración de proteína es de entre 120 g/l y 165 g/l. En otra realización, la solución de inmunoglobulina tiene un volumen de entre 3 litros y 100 litros. Este volumen de solución es equivalente a una masa total de inmunoglobulina de entre 300 g y 50.000 g. En una realización, el volumen es de entre 3,1 litros y 80 litros. A una concentración de proteína de entre 120 g/l y 165 g/l este volumen de solución es equivalente a una masa total de la inmunoglobulina de entre 370 g y 13.200 g. En una realización, la inmunoglobulina es un anticuerpo anti receptor IL13 alfa. En otra realización, la inmunoglobulina es un anticuerpo anti-HER2.

Otro aspecto como se describe aquí es un método para producir una inmunoglobulina comprende las siguientes etapas:

- cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina,
- recuperar la inmunoglobulina de la célula o el medio de cultivo, purificar la inmunoglobulina con uno o más pasos de cromatografía y proporcionar una solución de inmunoglobulina purificada y
- filtrar la solución de inmunoglobulina purificada a través de una combinación de filtros como se describe en este documento, es decir, una combinación de una primera y segunda unidad de filtro, por lo que la primera unidad de filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente, y la segunda unidad de filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , respectivamente, aplicando la solución a la combinación de filtros y aplicando presión.

En una realización, la célula es una célula procariota o una célula eucariota. En una realización en la que la célula es una célula procariótica, la célula se selecciona de células de E. coli, o células de bacillus. En una realización en la que la célula es una célula eucariota, la célula se selecciona de células de mamífero, en una realización especial de células CHO, células BHK, células HEK, células Per.C6@ y células de hibridoma. En una realización, la célula es una célula de mamífero seleccionada entre CHO-K1 y CHO DG44. En una realización, el cultivo está a una temperatura entre 20°C y 40°C, y durante un período de 4 a 28 días. En una realización, la purificación es con un paso de cromatografía de afinidad de proteína A y al menos una etapa seleccionada de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrofóbica.

Se ha encontrado que una combinación de una primera unidad de filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$  y 0,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente, y una segunda unidad de filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y 0,22  $\mu\text{m}$ , respectivamente, es ventajoso para procesar (filtrar) una solución de inmunoglobulina altamente concentrada permitiendo la filtración de un lote completo de una solución concentrada de inmunoglobulina sin necesidad de reemplazar el filtro.

Se ha encontrado además que en la combinación de filtros es ventajoso que cada uno de los dos filtros empleados en las unidades así como la combinación de filtros tenga aproximadamente el mismo área de filtro, es decir, dentro de dos veces el área del filtro más pequeño.

Se ha encontrado además que dependiendo de los componentes de la solución junto a la inmunoglobulina, diferentes intervalos de presión y concentración proporcionan procedimientos ventajosos.

Si la solución es una solución de inmunoglobulina concentrada con una concentración de 160 g/l o más, es decir, 165 g/l o 170 g/l, a la que no se ha añadido azúcar o tensioactivo, entonces se hace funcionar el método en una realización con una presión aplicada de 1,45 bar o más, en otra de 1,5 bar o más. Si la solución es una solución de inmunoglobulina concentrada con una concentración de 125 g/l o más, es decir, 130 g/l o 135 g/l, a la que se ha añadido al menos un azúcar y un tensioactivo, entonces el método se hace funcionar en una realización con una presión aplicada de 0,75 bar o menos, en otra realización de 0,7 bar o menos.

Se describen adicionalmente en el presente documento un equipo que comprende una primera unidad de filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$  y 0,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente, y una segunda unidad de filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y 0,22  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Otro aspecto que se describe aquí es el uso de un filtro que comprende una primera unidad de filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$  y 0,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente, y una segunda unidad de filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y 0,22  $\mu\text{m}$ , respectivamente, para la filtración de una solución de inmunoglobulina concentrada con una concentración de proteína de al menos 100 g/l.

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo alcance real se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Figuras

5  
Figura 1: Recorrido temporal del caudal de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 222 mg/ml y una presión aplicada de 2,0 bares (diamantes = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 1,2  $\mu\text{m}$ ; cuadrados = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$ ).

10  
Figura 2: Recorrido temporal del caudal de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 125 mg/ml suplementada con aproximadamente trehalosa 200 mM y Tween 20 al 0,05% (p/v) y una presión aplicada de 2,0 bares (diamantes = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 1,2  $\mu\text{m}$ ; cuadrados = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$ ).

15  
Figura 3: Recorrido temporal del caudal de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 162 mg/ml y una presión aplicada de 1,8 bares (diamantes = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 1,2  $\mu\text{m}$ ; cuadrados = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$ ).

20  
Figura 4: Recorrido temporal del caudal de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-IL13R $\alpha$  with con una concentración de anticuerpo de 141 mg/ml suplementada con aproximadamente trehalosa 200 mM y aproximadamente Poloxámero al 0,2% (p/v) y una presión aplicada de 1,6 bar (diamantes = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 1,2  $\mu\text{m}$ ; cuadrados = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$ ).

25  
Figura 5: Recorrido temporal del caudal de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 162 mg/ml y una presión aplicada de 1,1 bares (diamantes = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 1,2  $\mu\text{m}$ ; cuadrados = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$ ).

30  
Figura 6: Recorrido temporal del caudal de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-IL13R $\alpha$  con una concentración de anticuerpo de 141 mg/ml suplementado con trehalosa y poloxámero y una presión aplicada de 0,8 bares (diamantes = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 1,2  $\mu\text{m}$ ; cuadrados = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$ ).

35  
Figura 7: Recorrido temporal del caudal de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 125 mg/ml suplementado con trehalosa y Tween 20 y una presión aplicada de 0,8 bares (diamantes = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 1,2  $\mu\text{m}$ ; cuadrados = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$ ).

40  
Figura 8: Recorrido temporal del caudal de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 125 mg/ml suplementado con trehalosa y Tween 20 y una presión aplicada de 0,3 bares (diamantes = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 1,2  $\mu\text{m}$ ; cuadrados = combinación que contiene un filtro de tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$ ).

Ejemplo 1

Material y métodos

Anticuerpo

Un ejemplo de anticuerpo es una inmunoglobulina dirigida contra la proteína  $\alpha 1$  del receptor IL13 (anticuerpo anti-IL13R  $\alpha 1$ ) por ejemplo, como se describe en los Id. de Sec. nº: 01 a 12 del documento WO 2006/072564.

Otro ejemplo de inmunoglobulina es un anticuerpo anti-HER2 descrito en los documentos WO 92/022653, WO 99/057134, WO 97/04801, US 5.677.171 y US 5.821.337.

Filtro

En este documento se han empleado, de forma ejemplar, entre otros un cartucho de filtro Sartobran P de 0,45  $\mu\text{m}$  + 0,2  $\mu\text{m}$  y un cartucho de filtro Sartoclean CA de 3,0  $\mu\text{m}$  + 0,8  $\mu\text{m}$ . Ambos cartuchos de filtro están disponibles de Sartorius AG, Göttingen, Alemania.

Métodos analíticos

Cromatografía de exclusión por tamaño:

- 5 resina: TSK 3000 (Tosohaas):
- columna: 300 x 7,8 mm
- caudal: 0,5 ml/min
- tampón: fosfato de potasio 200 mM que contiene cloruro de potasio 250 mM, ajustado a pH 7,0
- 10 longitud de onda: 280 nm
- sistema de umbral de DNA: ver por ejemplo Merrick, H. y Hawlitschek, G., Biotech Forum Europe 9 (1992) 398-403
- 15 Proteína A ELISA: Los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con un IgG policlonal anti-proteína A derivado de pollo. Después de la unión, el anticuerpo no reaccionado se elimina lavando con tampón de muestra. Para la unión de la proteína A, se agrega un volumen de muestra definido a los pocillos. La proteína A presente en la muestra se une al anticuerpo de pollo y se retiene en los pocillos de la placa. Después de la incubación se retira la solución de muestra y se lavan los pocillos. Para la detección se añaden subsiguientemente un conjugado biotina-IgG policlonal anti-proteína A derivado de pollo y un conjugado de peroxidasa con estreptavidina. Después de otro paso de lavado se añade otra solución de sustrato, obteniendo la formación de un producto de reacción coloreado. La intensidad del color es proporcional al contenido de proteína A de la muestra. Después de un tiempo definido se detiene la reacción y se mide la absorbancia.
- 20
- 25

Proteína de célula huésped (HCP) ELISA: Las paredes de los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con una mezcla de albúmina de suero y estreptavidina. Un anticuerpo policlonal derivado de cabra contra HCP se une a las paredes de los pocillos de la placa de microtitulación. Después de un paso de lavado se incuban diferentes pocillos de la placa de microtitulación con una secuencia de calibración de HCP de diferentes concentraciones y solución de muestra. Después de la incubación el material de muestra no unido se elimina lavando con solución tampón. Para la detección, los pocillos se incuban con un conjugado de anticuerpo peroxidasa para detectar la proteína de la célula huésped unida. La actividad de peroxidasa fijada se detecta por incubación con ABTS y detección a 405 nm.

40 Ejemplo 2

Filtración de un anticuerpo anti-HER2 con un único filtro de tamaño de poro de 0,45 µm y 0,22 µm

45 En este ejemplo se muestra que una solución de inmunoglobulina altamente concentrada no puede filtrarse con un único filtro estéril con un tamaño de poro de 0,45 µm (prefiltro) y 0,22 µm (filtro principal) sin bloquear los poros del filtro con una carga de más de 2.460 g de proteína por metro cuadrado de área de filtro.

50 En este ejemplo se ha empleado un único filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm y 0,22 µm y un área de filtro total de 0,2 metros cuadrados.

Tabla 1: Soluciones empleadas en la filtración de un solo filtro.

Nº de solución	1	2	3	4	5
masa de proteína [g]	473	491	496	501	542
volumen [l]	3,940	4,200	4,134	4,139	4,516
carga [g/m <sup>2</sup> ]	2.365	2.455	2.480	2.505	2.710

Las soluciones de inmunoglobulina concentradas se filtraron a través del filtro único con los parámetros mostrados en la Tabla 2.

55

Tabla 2: Parámetros del proceso.

Nº de solución	1	2	3	4	5
volumen del caudal [l/h]	1,97	2,1	Caída a 0 debido al bloqueo de poros	Caída a 0 debido al bloqueo de poros	Caída a 0 debido al bloqueo de poros
masa del caudal [g/h]	237	246	Caída a 0 debido al bloqueo de poros	Caída a 0 debido al bloqueo de poros	Caída a 0 debido al bloqueo de poros

Para las soluciones nº 3 a 5, los poros del filtro individual se bloquearon antes de completar la filtración del volumen de lote. Para completar la filtración se tuvo que cambiar el filtro bloqueado, dando como resultado la necesidad de tiempo adicional y la pérdida de producto.

5

Tabla 3: Resultados de la filtración.

Nº de solución	1	2	3	4	5
masa de proteína que pasa el filtro [g/m <sup>2</sup> ]	2365	2455	960	968	1440
volumen que pasa por el filtro [l]	3,940	4,200	1,600	1,600	2,400
bloqueo de poros del filtro	NO	NO	SI	SI	SI

Ejemplo 3

10 Filtración de un anticuerpo anti-HER2 con una combinación de un primer filtro con un tamaño de poro de 3,0 µm y 0,8 µm y un segundo filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm y 0,22 µm

15 En este ejemplo se muestra que una solución de inmunoglobulina altamente concentrada se puede filtrar con una combinación de dos filtros con un tamaño de poro de 3,0 µm (prefiltro) y 0,8 µm (filtro principal) y de 0,45 µm (prefiltro) y 0,22 µm (filtro principal) sin bloquear los poros del filtro independientemente de la carga de proteína por metro cuadrado de área total del filtro.

20 En este ejemplo, se utilizó un filtro combinado con una primera unidad de filtro con un tamaño de poro de 3,0 µm y 0,8 µm, respectivamente, y una segunda unidad de filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm y 0,22 µm, respectivamente, y un área de filtro cada una de 0,6 metros cuadrados

Tabla 4: Soluciones empleadas en la filtración de filtro combinado.

Nº de solución	6	7	8	9	10
Masa de proteína [g]	5217	5191	5356	6151	5580
Volumen [l]	42,070	42,201	43,542	48,055	44,998
Carga [g/m <sup>2</sup> ]	4347,5	4325,8	4463,3	5125,8	4650,0

25 Las soluciones de inmunoglobulina concentradas se filtraron a través de la combinación de los dos filtros con los parámetros mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5: Parámetros del proceso.

Nº de solución	6	7	8	9	10
volumen del caudal [l/h]	38,95	42,20	43,54	33,02	45,00
masa del caudal [g/h]	4830	5191	5356	4226	5580

30 En ninguna de las soluciones Nº 6 a 10 se bloquearon los poros de los filtros combinados antes de completar la filtración del volumen de lote.

Tabla 6: Resultados de la filtración.

Nº de solución	6	7	8	9	10
Masa de proteína que pasa por el filtro [g/m <sup>2</sup> ]	4347,5	4325,8	4463,3	5125,8	4650,0
Volumen que pasa por el filtro [l]	42,070	42,201	43,542	48,055	44,998
Bloqueo de poros del filtro	NO	NO	NO	NO	NO

Ejemplo 4

35 Filtración de un anticuerpo anti-IL13R $\alpha$  con una combinación de filtros de un filtro con un tamaño de poro de 3,0 µm y 0,8 µm y un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm y 0,22 µm y ambos filtros con diferentes áreas de filtro

40 En este ejemplo se muestra que un eluato de proteína A condicionado puede filtrarse con una combinación de dos filtros pero debe reducirse el caudal si el área de filtro no coincide entre los dos filtros.

45 En este ejemplo, se utilizó una unidad de filtro con un tamaño de poro de 3,0 µm (prefiltro) y 0,8 µm (filtro principal) con un área de filtro de 1,8 metros cuadrados y una unidad de filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm (prefiltro) y 0,22 µm (filtro principal) con un área de filtro de 0,6 metros cuadrados.

Tabla 7: Soluciones empleadas en la filtración de filtro combinado.

Nº de solución	11	12	13	14	15
Masa de proteína [g]	1169,0	1299,6	1154,4	1220,4	1284,7
Volumen [l]	71,4	76,0	74,0	67,8	70,2
Carga [g/m <sup>2</sup> ]	487,1	541,5	481,0	508,5	535,3

Las soluciones de inmunoglobulina concentradas se filtraron a través del filtro combinado con los parámetros que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Parámetros de proceso.

Nº de solución	11	12	13	14	15
volumen del caudal [l/h]	Caída a 0 debido al bloqueo de poros	22	13	12	98
masa del caudal [g/h]	Caída a 0 debido al bloqueo de poros	376	203	216	1793

5 Para la solución Nº 11 se bloquearon los poros del filtro combinado antes de completar la filtración del volumen de lote. Para completar la filtración se tuvo que cambiar el filtro bloqueado, dando como resultado la necesidad de tiempo adicional y la pérdida de producto.

Tabla 9: Resultados de la filtración.

Nº de solución	1	2	3	4	5
masa de proteína que pasa el filtro [g/m <sup>2</sup> ]	347,9	541,5	481,0	508,5	535,3
volumen que pasa por el filtro [l]	51,0	76,0	74,0	67,8	70,2
bloqueo de poros del filtro	SI	NO	NO	NO	NO

10 Con el fin de evitar el bloqueo del filtro como en el experimento con la solución Nº 11, el caudal a través de la membrana tuvo que reducirse en los experimentos con las soluciones Nº 12 a 14. En el experimento con la solución Nº 15, el eluato de la proteína A se decantó dando como resultado una pérdida de proteína.

15 Ejemplo 5

Filtración de un anticuerpo anti-IL13R $\alpha$  con una combinación de filtros de un filtro con un tamaño de poro de 3,0  $\mu$ m y 0,8  $\mu$ m y un filtro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m y 0,22  $\mu$ m y ambos filtros con el mismo área de filtro

20 En este ejemplo se muestra que un eluato de proteína A condicionado puede filtrarse con una combinación de dos filtros sin una reducción del caudal si el área de filtro coincide entre los dos filtros.

25 En este ejemplo la unidad de filtro con un tamaño de poro de 3,0  $\mu$ m y 0,8  $\mu$ m tiene un área de filtro de 0,2 metros cuadrados y la unidad de filtro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m y 0,22  $\mu$ m tiene un área de filtro de 0,2 metros cuadrados.

Tabla 10: Soluciones empleadas en la filtración de filtro combinado.

Nº de solución	16	17	18	19	20
Masa de proteína [g]	495	634	825	861	956
Volumen [l]	3,5	4,14	5,5	5,6	6,3
Carga [g/m <sup>2</sup> ]	1237,5	1585,0	2062,5	2152,5	2,390

30 En ninguna de las soluciones Nº 16 a 20 los poros de los filtros combinados se bloquearon antes de completar la filtración del volumen de lote.

Tabla 11: Resultados de la filtración.

Nº de solución	16	17	18	19	20
Masa de proteína que pasa el filtro [g/m <sup>2</sup> ]	1237,5	1585,0	2062,5	2152,5	2,390
Volumen que pasa por el filtro [l]	3,5	4,14	5,5	5,6	6,3
Bloqueo de poros del filtro	NO	NO	NO	NO	NO

35 Ejemplo 6

Filtración de diferentes soluciones de anticuerpos con diferentes combinaciones de filtros con diferentes concentraciones de proteína, diferentes compuestos en disolución y diferentes presiones aplicadas

40 Las soluciones que comprenden un anticuerpo anti-IL13R $\alpha$  o un anticuerpo anti-HER2 se filtraron con una combinación de filtros que emplean diferentes áreas de filtro y tamaño de poro de filtro, así como diferentes excipientes y diferente presión aplicada.

45 Las combinaciones de filtros usados se enumeran en la Tabla 12. A continuación, se utilizará la denominación 'A1', 'A2', 'B1' y 'B2'.

Tabla 12: combinaciones de filtros

Combinación	tamaño de poro del filtro 1/diámetro	tamaño de poro del filtro 2/diámetro	tamaño de poro del filtro 3/diámetro	tamaño de poro del filtro 4/diámetro
A1	1,2 µm/26 µm	0,8 µm/26 µm	0,45 µm/26 µm	0,2 µm/26 µm
A2	1,2 µm/47 µm	0,8 µm/26 µm	0,45 µm/26 µm	0,2 µm/26 µm
B1	3,0 µm/26 µm	0,8 µm/26 µm	0,45 µm/26 µm	0,2 µm/26 µm
B2	3,0 µm/47 µm	0,8 µm/26 µm	0,45 µm/26 µm	0,2 µm/26 µm

En las siguientes Tablas 13 a 20 y en las Figuras 1 a 8 correspondientes se presentan los resultados obtenidos con diferentes combinaciones de filtros, diferentes soluciones de anticuerpo y diferentes condiciones de filtración.

5

Tabla 13: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 222 mg/ml y una presión aplicada de 2,0 bares.

Combinación	duración de la filtración [min]	caudal [ml/min]	combinación	duración de la filtración [min]	caudal[ml/min]
A1	1	3,7	B1	1	3,4
	2	3,5		2	3,2
	3	3,2		3	3,1
	4	3,0		4	3,0
	5	2,9		5	2,8
	6	2,6		6	2,9
	7	2,5		7	2,8
	8	2,3		8	2,7
	9	2,0		9	2,7
	10	2,0		10	2,7
	11	1,7		11	2,7
	12	1,6		12	2,5
	13	1,5		13	2,6
	14	1,3		14	2,5
	15	1,2		15	2,5

10 Tabla 14: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 125 mg/ml suplementado con aproximadamente trehalosa 200 mM y Tween 20 al 0,05% (p/v) y una presión aplicada de 2,0 bares.

Combinación	duración de la filtración [min]	caudal [ml/min]	combinación	duración de la filtración [min]	caudal[ml/min]
A1	1	22,4	B1	1	20,1
	2	20,2		2	17,7
	3	18,3		3	15,5
	4	16,8		4	13,8
	5	15,9		5	12,2
	6	14,3		6	11,1
	7	13,1		7	10,0
	8	12,3		8	8,7
	9	11,3		9	8,1
	10	10,3		10	7,0
	11	9,7		11	6,6
	12	9,2		12	5,8
	13	8,4		13	5,2
	14	8,1		14	4,8
	15	7,4		15	4,3

Tabla 15: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 162 mg/ml y una presión aplicada de 1,8 bar.

Combinación	duración de la filtración [min]	caudal [ml/min]	combinación	duración de la filtración [min]	caudal[ml/min]
A2	1	7,6	B2	1	8,1
	2	6,5		2	6,9
	3	6,1		3	6,4
	4	5,7		4	6,2
	5	5,4		5	5,9
	6	5,1		6	5,6
	7	5,2		7	5,5

	8	5,0		8	5,3
	9	4,9		9	5,2
	10	4,7		10	5,1
	11	4,8		11	5,0
	12	4,8		12	4,8
	13	4,6		13	4,9
	14	4,7		14	4,6
	15	4,6		15	4,6

Tabla 16: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-IL13R $\alpha$  con una concentración de anticuerpo de 141 mg/ml suplementada con aproximadamente 200 mM de trehalosa y aproximadamente 0,2% (p/v) de Poloxámero y una presión aplicada de 1,6 bar.

Combinación	duración de la filtración [min]	caudal [ml/min]	combinación	duración de la filtración [min]	caudal[ml/min]
A2	1	15,6	B2	1	13,2
	2	9,4		2	8,1
	3	7,0		3	5,5
	4	5,5		4	4,1
	5	4,6		5	3,3
	6	3,8		6	2,6
	7	3,3		7	2,3
	8	2,9		8	1,9
	9	2,5		9	1,6
	10	2,2		10	1,5
	11	1,5		11	1,2
	12	0,5		12	1,2
	13	0,3		13	1,0
	14	0,3		14	0,9
	15	0,3		15	0,8

5

Tabla 17: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 162 mg/ml y una presión aplicada de 1,1 bar.

Combinación	duración de la filtración [min]	caudal [ml/min]	combinación	duración de la filtración [min]	caudal[ml/min]
A1	1	4,4	B1	1	4,3
	2	4,0		2	4,0
	3	3,6		3	3,5
	4	3,5		4	3,0
	5	3,3		5	3,0
	6	3,2		6	3,0
	7	3,2		7	2,9
	8	3,1		8	2,8
	9	3,1		9	2,8
	10	2,9		10	2,7
	11	3,0		11	2,6
	12	2,9		12	2,8
	13	2,8		13	2,5
	14	2,8		14	2,6
	15	2,8		15	2,5

10

Tabla 18: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-IL13R $\alpha$  con una concentración de anticuerpo de 141 mg/ml suplementada con trehalosa y Poloxámero y una presión aplicada de 0,8 bar

Combinación	duración de la filtración [min]	caudal [ml/min]	combinación	duración de la filtración [min]	caudal[ml/min]
A2	1	7,6	B2	1	8,1
	2	5,0		2	5,5
	3	3,7		3	4,2
	4	2,9		4	3,1
	5	2,5		5	2,6
	6	2,1		6	2,2
	7	1,8		7	1,8
	8	1,5		8	1,5
	9	1,4		9	1,4

ES 2 604 103 T3

	10	1,2		10	1,2
	11	1,1		11	1,1
	12	1,0		12	1,0
	13	0,9		13	0,8
	14	0,8		14	0,8
	15	0,8		15	0,8

Tabla 19: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo 125 mg/ml suplementada con trehalosa y Tween 20 y una presión aplicada de 0,8 bar.

Combinación	duración de la filtración [min]	caudal [ml/min]	combinación	duración de la filtración [min]	caudal[ml/min]
A1	1	9,3	B1	1	9,7
	2	8,7		2	8,8
	3	8,1		3	8,4
	4	7,9		4	8,0
	5	7,7		5	7,4
	6	7,2		6	7,0
	7	7,1		7	6,4
	8	6,6		8	6,1
	9	6,2		9	5,7
	10	6,0		10	5,4
	11	5,6		11	5,0
	12	5,3		12	4,6
	13	5,0		13	4,5
	14	4,8		14	4,1
	15	4,5		15	3,3

5 Tabla 20: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo 125 mg/ml suplementada con trehalosa y Tween 20 y una presión aplicada de 0,3 bar

Combinación	duración de la filtración [min]	caudal [ml/min]	combinación	duración de la filtración [min]	caudal[ml/min]
A1	1	3,9	B1	1	3,7
	2	3,2		2	4,8
	3	3,0		3	4,6
	4	2,7		4	3,8
	5	2,6		5	4,0
	6	2,3		6	3,8
	7	2,1		7	3,8
	8	2,0		8	3,7
	9	1,8		9	3,6
	10	1,5		10	3,6
	11	1,4		11	3,5
	12	1,3		12	3,5
	13	1,2		13	3,3
	14	1,1		14	3,3
	15	1,1		15	3,2

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir una solución de inmunoglobulina que comprende
- 5 a) proporcionar una solución de inmunoglobulina con una concentración de proteína de al menos 100 g/l;  
b) aplicar la solución de inmunoglobulina a una combinación de una primera y una segunda unidad de filtro, por lo que la primera unidad de filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,8  $\mu\text{m}$  y una segunda unidad de filtro que comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  con una presión desde 0,1 a 4,0 bar, y de este modo producir una solución de inmunoglobulina.
- 10
2. Un método para producir una inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas
- 15 a) cultivar una célula, que comprende un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina  
b) recuperar la inmunoglobulina de la célula o el medio de cultivo,  
c) purificar la inmunoglobulina con una o más etapas de cromatografía y proporcionar una solución de inmunoglobulina,  
d) añadir opcionalmente un azúcar, un aminoácido y/o un detergente a la solución,  
e) concentrar la solución de inmunoglobulina a una concentración de 100 g/l o más con un método seleccionado de diafiltración o filtración de flujo tangencial, y  
20 f) aplicar la solución de inmunoglobulina de la etapa anterior a una combinación de una primera y segunda unidad de filtro, por lo que la primera unidad de filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 3,0  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,8  $\mu\text{m}$  y la segunda unidad de filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  con una presión de 0,1 a 4,0 bar, y de este modo producir una solución de inmunoglobulina.
- 25
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el filtro en la primera y segunda unidad de filtro tiene aproximadamente el mismo área de filtro.
- 30
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la solución de inmunoglobulina tiene una concentración de entre 100 g/l y 300 g/l.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la solución de inmunoglobulina tiene un volumen de entre 3 litros y 100 litros.
- 35
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la inmunoglobulina es un anticuerpo anti-receptor de IL13 alfa o un anticuerpo anti-HER2.
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, caracterizado porque la purificación se realiza con una etapa de cromatografía de afinidad de proteína A y al menos una etapa se selecciona de entre cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrofóbica.
- 40
8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la solución de inmunoglobulina tiene una concentración de 160 g/l o más y la aplicación a la combinación de filtros se realiza mediante la aplicación de una presión de 1,45 bar o más.
- 45
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la solución de inmunoglobulina comprende un azúcar y un tensioactivo y tiene una concentración de 125 mg/ml o más y la aplicación a la combinación de filtros se realiza mediante la aplicación de una presión de 0,75 bar o menos.
- 50

Fig. 1

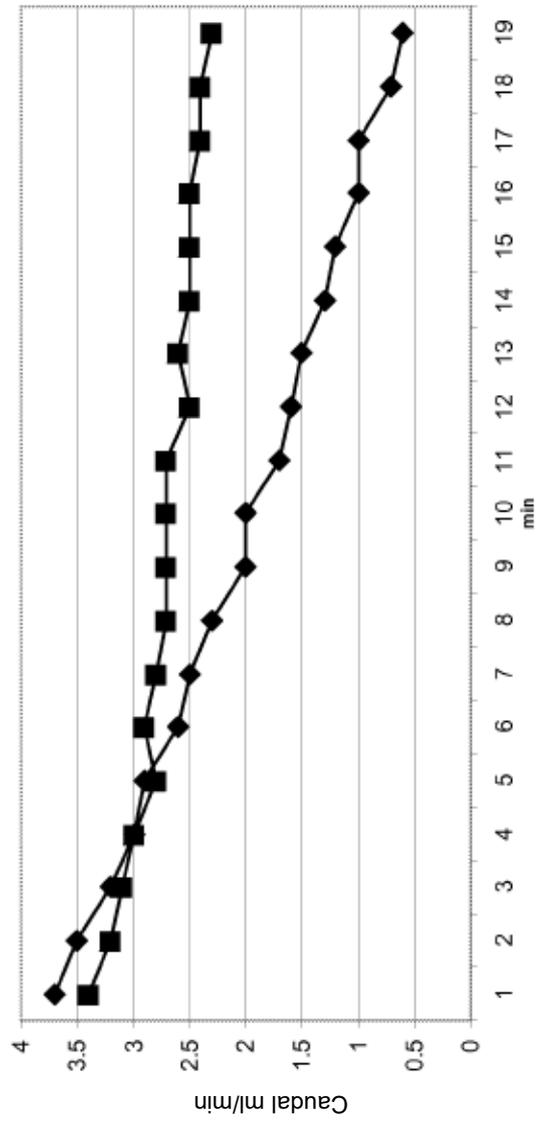


Fig. 2

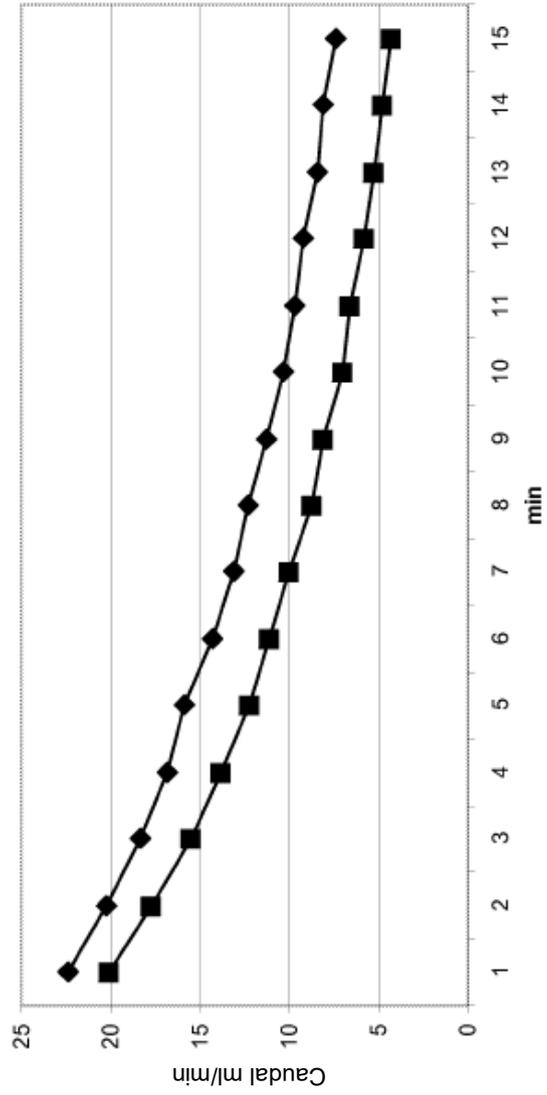


Fig. 3

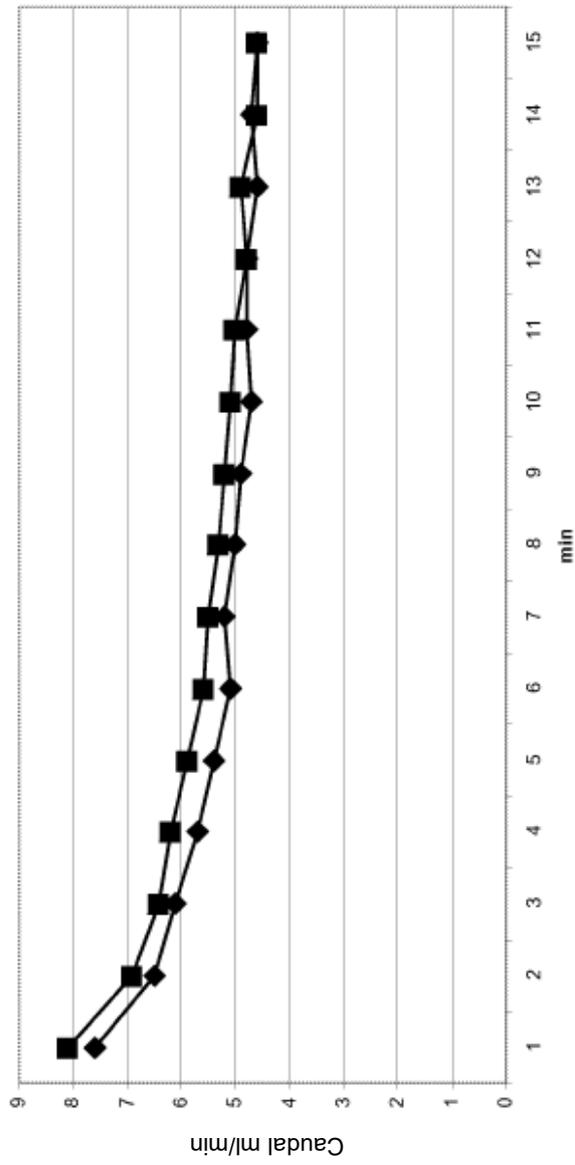


Fig. 4

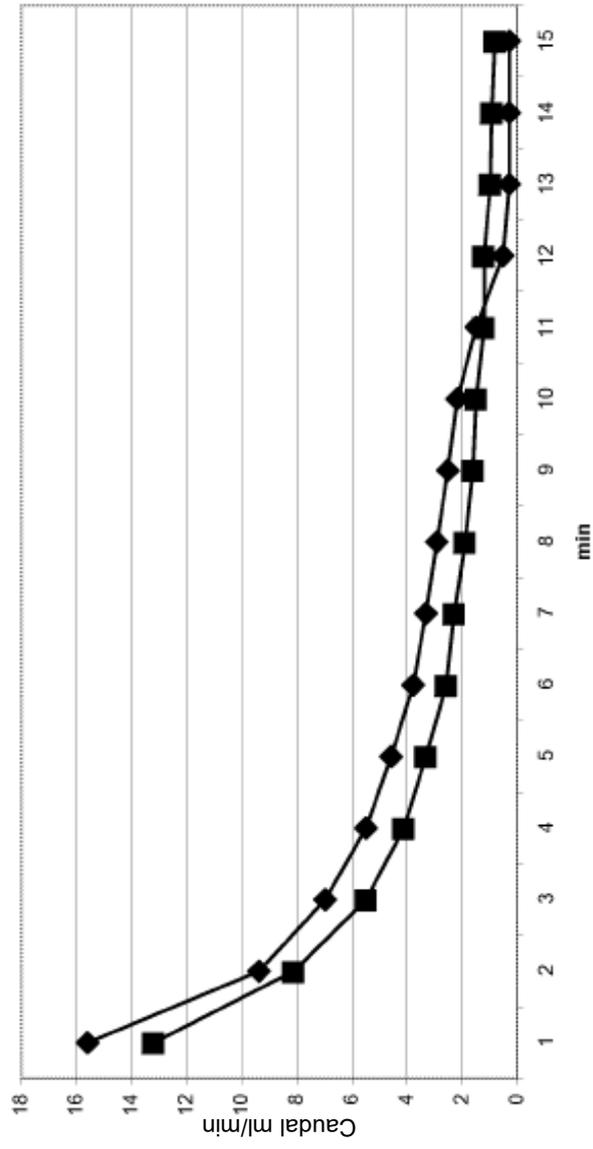


Fig. 5

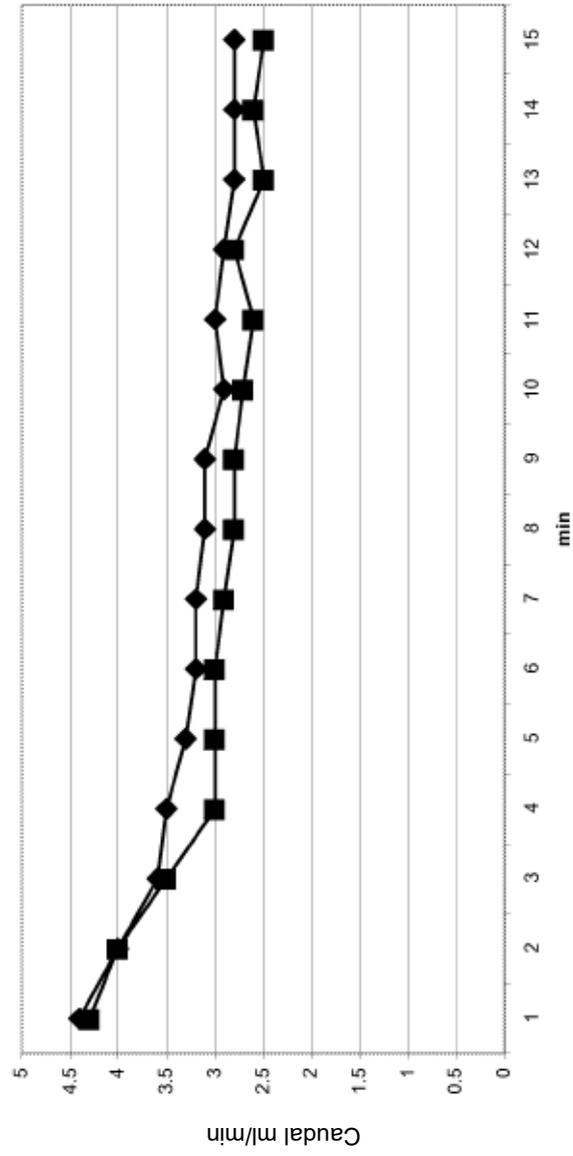


Fig. 6

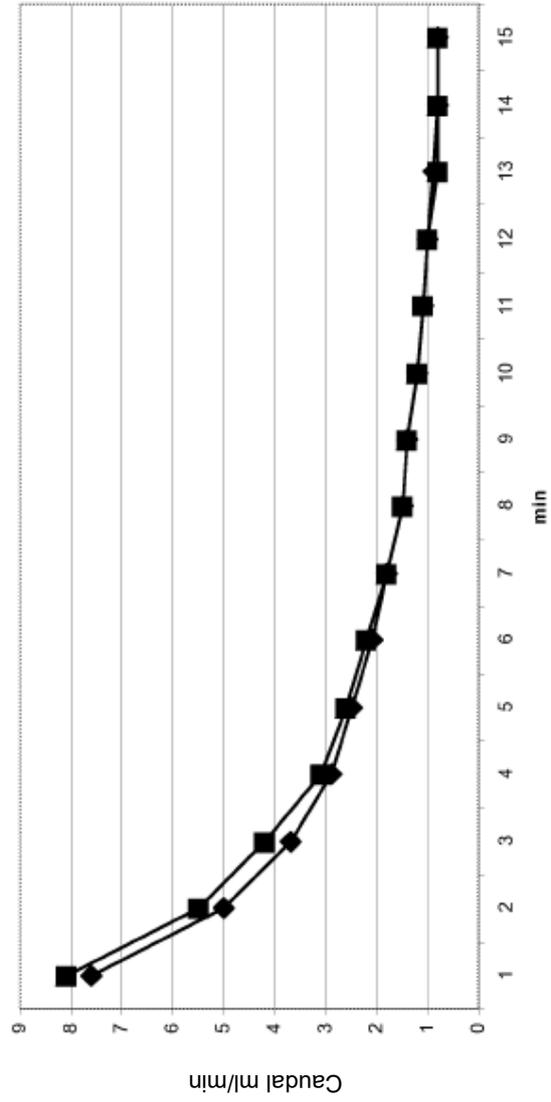


Fig. 7

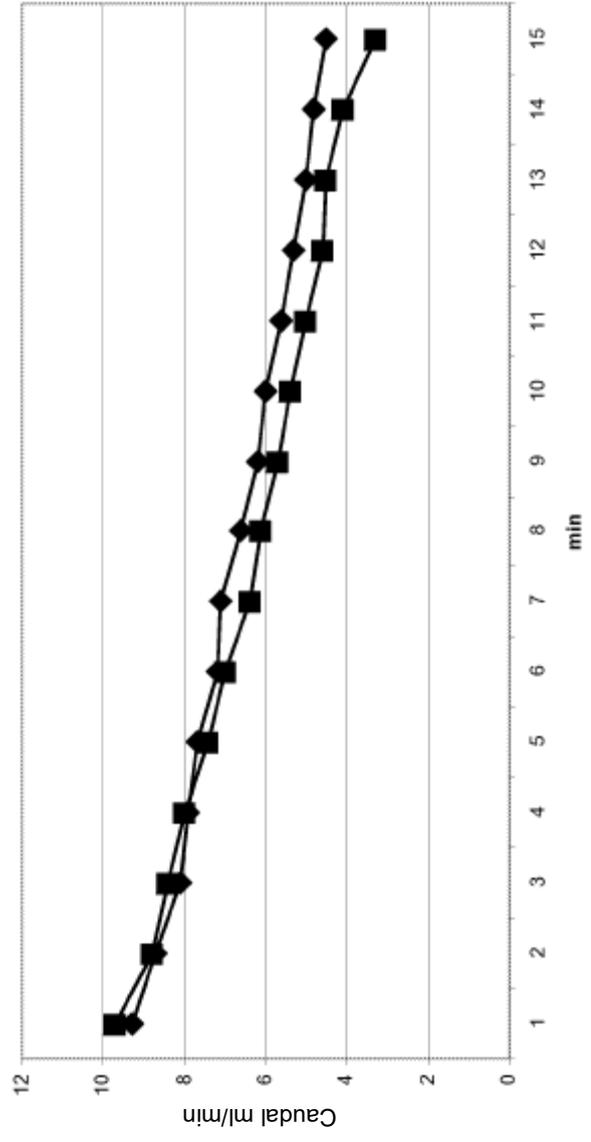


Fig. 8

