

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 558**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/EP2013/055390**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13170977**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13712722 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2850099**

54 Título: **Soluciones proteínicas estabilizadas**

30 Prioridad:

**14.05.2012 EP 12167958**  
**25.05.2012 US 201261651598 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.07.2017**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)**  
**Novo Allé**  
**2880 Bagsværd, DK**

72 Inventor/es:

**JENSEN, OLE ELVANG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 622 558 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

Soluciones proteínicas estabilizadas

5 La actual invención se refiere a la ultrafiltración de soluciones concentradas que contienen proteínas, particularmente la ultrafiltración de soluciones concentradas que contienen anticuerpos, particularmente la estabilización de estas soluciones durante la ultrafiltración.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Una cantidad de soluciones inyectables que contienen proteínas, particularmente soluciones que contienen anticuerpos se suministra al mercado. El uso de esas soluciones para la inyección subcutánea da por resultado el requerimiento de una alta concentración de las soluciones debido a limitaciones en el volumen de inyección.

10 Los métodos generales para la purificación de anticuerpos son bien conocidos en el campo y se describen por ejemplo en Pete Gagnon: Purification Tools for monoclonal Antibodies (1996) ISBN-9653515-9-9.

Shire SJ (2009): "Formulation and manufacturability of biologics", Curr Opin Biotech 20:708-714, describe métodos para mejorar la estabilidad de las proteínas durante la ultrafiltración de soluciones proteínicas sumamente concentradas, tales como la adición de arginina o el aumento de la fuerza iónica de la solución.

15 Después de la purificación del anticuerpo en solución, la concentración del anticuerpo se incrementa mediante el uso de la ultrafiltración (UF, por sus siglas en inglés) y luego, en algún punto (usualmente alrededor de una concentración de 50 g/L de anticuerpo (mAb)), el amortiguador Ref. 251967 de formulación es diafiltrado en la solución por medio de la ultrafiltración, luego la solución formulada se concentra usualmente de manera adicional a su concentración final entre 100 g/L y 300 g/L, sin sacarosa, la cual se agregará normalmente al producto después de la concentración por  
20 ultrafiltración final. Durante la concentración de la proteína/anticuerpos por medio de la ultrafiltración, la concentración de proteínas en la superficie de la membrana, la comúnmente llamada concentración de pared, se puede incrementar a niveles altos. Esto puede resultar peligroso para la proteína/anticuerpo y causa que se desnaturalice y precipite. Frecuentemente se asume que esta es la razón de las diferencias observadas en la concentración calculada de proteínas y la concentración medida de proteínas.

25 El problema con una concentración diferente por medio del cálculo en base a factores de reducción contra la concentración medida real por medio de la absorbencia a UV280 nm en el producto retenido, afecta el rendimiento del proceso de ultrafiltración. La solución conocida para este problema es tratar de recuperar la proteína al lavar el modulo varias veces con amortiguadores pero la proteína recuperada aparecerá en concentraciones reducidas en gran medida.

30 Por lo tanto, existe la necesidad de un método que resuelva el problema de desnaturalización y precipitación de soluciones proteínicas sumamente concentradas durante la ultrafiltración.

Se ha mostrado que la alta concentración de sacarosa en soluciones proteínicas puede estabilizar la proteína en solución, especialmente contra la agregación durante el almacenamiento prolongado de estas soluciones. Sin embargo, el riesgo de infecciones puede haber dado por resultado evitar la sacarosa como componente durante la ultrafiltración u otros pasos de purificación o concentración.

### 35 RESUMEN

La presente invención proporciona un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada. Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para estabilizar una solución proteínica sumamente concentrada durante la ultrafiltración.

40 La presente invención proporciona un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada en este documento, la solución proteínica es estabilizada durante la ultrafiltración por medio de la adición de sacarosa a la solución. Adicionalmente, la presente invención proporciona un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, en donde la proteína es un anticuerpo.

### DESCRIPCIÓN

La presente invención proporciona un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada. Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para estabilizar una solución proteínica sumamente concentrada durante la ultrafiltración.

5 Se ha descubierto sorprendentemente que la adición de sacarosa a una solución proteínica sumamente concentrada antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración parece proteger a la proteína de la desnaturalización y la precipitación durante la ultrafiltración. Esto da por resultado un % más alto de rendimiento o recuperación de la proteína y menos turbidez y formación de agregados, medido por medio del % de HMWP durante la ultrafiltración.

10 El término "proteína", "polipéptido" y "péptido" como se utiliza en este documento significa un compuesto constituido por al menos cinco aminoácidos constituyentes que son conectados por enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes pueden ser del grupo de aminoácidos codificados por el código genético y pueden ser aminoácidos naturales los cuales no son codificados por el código genético, así como también aminoácidos sintéticos. Los aminoácidos naturales los cuales no son codificados por el código genético son por ejemplo hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos comprenden aminoácidos manufacturados por medio de la síntesis química, es decir D-isómeros de los aminoácidos codificados por el código genético tales como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico), Abu (ácido  $\alpha$ -aminobutírico), Tle (terc-butilglicina),  $\beta$ -alanina, ácido 3-aminometilbenzoico y ácido antranílico.

15 El término "anticuerpo" y/o "mAb" como se utiliza en este documento cubre anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos de longitud completa los cuales tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas de cadena individual, así como también fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv).

20 El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son sumamente específicos, siendo dirigidos contra un sitio antigénico individual. Adicionalmente, en contraste a las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales las cuales incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante individual en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos debido a que son sintetizados por el cultivo de hibridoma, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como se obtiene de la población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por medio de algún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizan de acuerdo con la presente invención se pueden hacer por medio del método de hibridoma descrito primero por Kohler y colaboradores, Nature, 256: 495 (1975) o se pueden hacer por medio de métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de colecciones de anticuerpos de fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson y colaboradores, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks y colaboradores, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

25 Los anticuerpos monoclonales en este documento pueden extenderse para incluir anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico con u homólogo a secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como también fragmentos de estos anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; Morrison y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 81: 6851-6855 (1984)).

30 Los ejemplos de anticuerpos adecuados, los cuales se pueden formular en una composición estable de la invención incluyen: 3F8, Abagovomab, Abciximab, ACZ885 (canakinumab), Adalimumab, Adecatumumab, Afelimomab, Afutuzumab, Alacizumabpegol, Alemtuzumab, Altumomabpentetato, Anatumomabmafenatox, Anrukinzumab (IMA- 638), Apolizumab, Arcitumomab, Aselizumab, Atlizumab (tocilizumab), Atorolimumab, Bapineuzumab, Basiliximab, Baviximab, Bectumomab, Belimumab, Bertilimumab, Besilesomab, Bevacizumab, Biciromab, Bivatuzumabmertansina, Blinatumomab, Brentuximabvedotina, Briakinumab, Canakinumab, Cantuzumabmertansina, Capromabpendetida, Catumaxomab, Cedelizumab, Certolizumabpegol, Cetuximab, Citatuzumabbogatox, Cixutumumab, Clenoliximab, Clivatuzumabtetraxetano, ONTO 148 (golimumab), CNTO 1275 (ustekinumab), Conatumumab, Dacetuzumab, Daclizumab, Denosumab, Detumomab, Dorlimomabaritox, Dorlixizumab, Ecomeximab, Eculizumab, Edobacomab, Edrecolomab, Efalizumab, Efungumab, Elsilimomab, Enlimomabpegol, Eptumomabcituxetano, Epratuzumab, Erlizumab, Ertumaxomab, Etaracizumab, Exbivirumab, Fanolesomab, Faralimomab, Felvizumab, Fezakinumab, Figitumumab, Fontolizumab, Foravirumab, Fresolimumab, Galiximab, Gantenerumab, Gavilimumab, Gemtuzumabozogamicina, Golimumab, Gomiliximab, Ibalizumab, Ibritumomabtiuxetano, Igovomab, Imciromab, Infliximab, Intetumumab, Inolimomab, Inotuzumabozogamicina, Ipilimumab, Iratumumab, Keliximab, Labetuzumab, Lebrikizumab, Lemaesomab, Lerdelimumab, Lexitatumumab, Libivirumab, Lintuzumab, Lucatumumab, Lumiliximab, Mapatumumab, Maslimomab,

Matuzumab, Mepolizumab, Metelimumab, Milatuzumab, Minretumomab, Mitumomab, Morolimumab, Motavizumab, Muromonab-CD3, MYO-029 (stamulumab), Nacolomabtafenatox, Naptumomabestafenatox, Natalizumab, Nebacumab, Necitumumab, Nerelimomab, Nimotuzumab, Nofetumomabmerpentano, Ocrelizumab, Odulimumab, Ofatumumab, Omalizumab, Oportuzumabmonatox, Oregovomab, Otelixizumab, Pagibaximab, Palivizumab, Panitumumab, Panobacumab, Pascolizumab, Pentumomab, Pertuzumab, Pexelizumab, Pintumomab, Priliximab, Pritumumab, PRO 140, Rafivirumab, Ramucirumab, Ranibizumab, Raxibacumab, Regavirumab, Reslizumab, Rilotumumab, Rituximab, Robatumumab, Rentalizumab, Rovelizumab, Ruplizumab, Satumomab, Sevirumab, Sibrotuzumab, Sifalimumab, Siltuximab, Siplizumab, Solanezumab, Sonepcizumab, Sontuzumab, Estamulumab, Sulesomab, Tacatumabtetraetano, Tadocizumab, Talizumab, Tanezumab, Taplitumomabpaptox, Tefibazumab, Telimomabaritox, Tenatumomab, Teneliximab, Teplizumab, TGN1412, Ticilimumab (tremelimumab), Tigatuzumab, TNX-355 (ibalizumab), TNX-650, TNX-901 (talizumab), Tocilizumab (atlizumab), Toralizumab, Tositumomab, Trastuzumab, Tremelimumab, Tucotuzumabcelmoleukin, Tuvirumab, Urtoxazumab, Ustekinumab, Vapaliximab, Vedolizumab, Veltuzumab, Vepalimumab, Visilizumab, Volociximab, Votumumab, Zalutumumab, Zanolimumab, Ziralimumab, Zolimomabaritox y similares.

En una modalidad, la proteína es una inmunoglobulina. En una modalidad, la proteína es un anticuerpo. En una modalidad, la proteína es anticuerpo monoclonal (mAb). En una modalidad, la proteína es un anticuerpo de IgG4.

En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo anti-IL20 monoclonal. En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo anti-IL20 como se describe en el documento W02010/000721. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-IL20 es 15D2 o 5B7 como se describe en el documento WO2010/000721.

Se apreciará que la invención tiene utilidad particular donde la proteína está presente en solución para ser ultrafiltrada en altas concentraciones. De esta manera, en una modalidad, la proteína está presente en una concentración de 40 g/L o más en la solución a ser ultrafiltrada, tal como 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 250, 300 g/L o más.

El producto retenido de la ultrafiltración final tendrá concentraciones de proteína más altas, tal como en una cantidad entre 75 g/L y 400 g/L, por ejemplo entre 75 g/L y 350 g/L, tal como entre 75 g/L y 300 g/L, por ejemplo entre 100 g/L y 250 g/L, tal como entre 75 g/L y 200 g/L, por ejemplo entre 75 g/L y 150 g/L, tal como entre 75 g/L y 100 g/L. En una modalidad, la proteína está presente en el producto retenido de la ultrafiltración en una concentración entre 100 g/L y 400 g/L, por ejemplo entre 100 g/L y 350 g/L, tal como entre 100 g/L y 300 g/L, por ejemplo entre 100 g/L y 250 g/L, tal como entre 100 g/L y 200 g/L, por ejemplo entre 100 g/L y 150 g/L. En una modalidad, la proteína está presente en el producto retenido de la ultrafiltración en una concentración entre 125 g/L y 400 g/L, por ejemplo entre 125 g/L y 350 g/L, tal como entre 125 g/L y 300 g/L, por ejemplo entre 125 g/L y 250 g/L, tal como entre 125 g/L y 200 g/L, por ejemplo entre 125 g/L y 150 g/L. En una modalidad, la proteína está presente en una concentración entre 150 g/L y 400 g/L, tal como entre 150 g/L y 350 g/L, por ejemplo entre 150 g/L y 300 g/L, tal como entre 150 g/L y 250 g/L, por ejemplo entre 150 g/L y 200 g/L.

El término "estabilidad" de una proteína en una composición como se utiliza en este documento, se refiere a la estabilidad biológica, estabilidad física o estabilidad química de la proteína en solución. Los cambios covalentes químicos en la estructura de la proteína que conducen a la formación de productos de degradación química con una posible potencia biológica menor y/o posibles propiedades inmunogénicas incrementadas en comparación con la estructura de la proteína nativa, durante el proceso de manufactura. Varios productos de degradación química se pueden formar dependiendo del tipo y la naturaleza de la proteína nativa y el ambiente al cual se expone la proteína. Más probablemente, la eliminación de la degradación química puede no ser evitada completamente y frecuentemente se observan cantidades crecientes de productos de degradación química durante el almacenamiento y el uso de la composición proteínica, lo cual es bien sabido por la persona experta en el campo. La mayoría de proteínas son propensas a la desamidación, un proceso en el cual el grupo amida de cadena lateral en residuos de glutaminilo o asparaginilo es hidrolizado para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación involucran la formación de productos de transformación de peso molecular alto donde dos o más moléculas de proteína se enlazan covalentemente entre sí a través de interacciones de transamidación y/o disulfuro lo que conduce a la formación de productos de degradación diméricos, oligoméricos y poliméricos enlazados covalentemente (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. and Manning M.C., Plenum Press, Nueva York 1992). La oxidación (de por ejemplo residuos de metionina) se puede mencionar como otra variante de la degradación química. La estabilidad química de la composición proteínica se puede evaluar al medir la cantidad de los productos de degradación química en varios puntos de tiempo después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (la formación de productos de degradación puede ser acelerada frecuentemente, por ejemplo, al incrementar la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual se determina frecuentemente por medio de la separación de los productos de degradación dependiendo del tamaño molecular y/o la carga utilizando varias técnicas de cromatografía (por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

Existen varias técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas que están disponibles en el campo (Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed. and Marcel Dekker, NY. Pubs 1991; y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90, 1993).

La SEC-HPLC se utiliza en particular para la cuantificación de agregados de proteínas. Las muestras pueden ser analizadas por ejemplo utilizando una columna TSK G3000 SWXL, la elución isocrática y la detección de luz UV subsecuente a 214 o 280 nm. Este método se utiliza para determinar el contenido de IgG monomérica y el % de Proteínas de Peso Molecular Alto (HMWP, por sus siglas en inglés) que consisten en especies diméricas o más grandes las cuales son separadas según el tamaño por medio de la resina de gel. El contenido monomérico y el % de HMWP se determinan en relación con el contenido total de proteínas detectado por medio del método.

La estabilidad física de una solución proteínica se puede medir por medio de métodos bien conocidos, que incluyen la medición de una atenuación de luz por medio de la medición de absorbencia o densidad óptica. Estas mediciones se refieren a la turbidez de la solución.

El término "turbidez" de una solución como se utiliza en este documento se refiere a la presencia de nubosidad o brumosis en la solución proteínica. En soluciones proteínicas, la turbidez se mide típicamente utilizando un espectrofotómetro de luz UV-visible en longitudes de onda entre 320-800 nm. El grado de turbidez se puede calcular por referencia a una curva estándar generada por soluciones con turbidez conocida. Para las soluciones farmacéuticas que contienen proteínas, los estándares de referencia se pueden basar en la Farmacopea Europea (Ph Eur.) Sección 2.2.1, que define la claridad visual y describe los niveles estándar de turbidez en relación con el agua.

El término ultrafiltración (UF) como se utiliza en este documento se refiere a una variedad de filtración a través de membrana en la cual la presión hidrostática fuerza a un líquido o una solución contra una membrana semipermeable. Los solutos de peso molecular alto son retenidos (producto retenido), mientras que el agua y los solutos de peso molecular bajo pasan a través de la membrana (permean o filtran). Este proceso de separación se utiliza en la industria y la investigación para purificar y concentrar soluciones macromoleculares ( $10^3 - 10^6$ Da), especialmente soluciones proteínicas. La ultrafiltración se aplica especialmente en el modo de filtración de flujo cruzado. El término producto retenido, como se utiliza en este documento, se refiere a lo que es retenido, es decir la porción o contenido del líquido o solución que no pasa a través de la membrana de ultrafiltración. El término producto filtrado, como se utiliza en este documento se refiere a la porción o parte del líquido o solución que pasa a través de la membrana durante la ultrafiltración y no es retenido.

El factor de concentración es un número el cual es recíproco a la reducción del volumen del producto retenido durante la concentración por medio de ultrafiltración. Cuando el volumen de producto retenido se reduce a 1/2, el factor de concentración será 2. El término "concentración calculada" como se utiliza en este documento se refiere a una concentración estimada que se calcula al multiplicar la concentración original de mAb por el factor de concentración.

El término "rendimiento" o " % de recuperación" como se utiliza en este documento, se refiere a la cantidad de proteína recuperada durante el paso o pasos de ultrafiltración, en el producto retenido o productos retenidos si se han realizado múltiples pasos de ultrafiltración o lavado, en comparación con la cantidad total de proteína en la solución de proteína de inicio que es ultrafiltrada.

El término filtración de flujo cruzado como se utiliza en este documento se refiere a un método de purificación de proteínas, conocido también como filtración de flujo tangencial que es un tipo de filtración (una operación unitaria particular). La filtración de flujo cruzado es diferente de la filtración en línea en la cual la alimentación se pasa a través de una membrana o lecho, los sólidos son atrapados en el filtro y el producto filtrado es liberado en el otro extremo. La filtración de flujo cruzado obtiene su nombre debido a que la mayor parte del flujo de alimentación viaja tangencialmente a través de la superficie del filtro, en lugar de dentro del filtro. La ventaja principal de esto es que la torta de filtro (la cual puede cegar el filtro) se lava sustancialmente durante el proceso de filtración, incrementado la cantidad de tiempo que la unidad de filtro puede ser operacional. Puede ser un proceso continuo, a diferencia de la filtración en línea de modo discontinuo.

En la filtración de flujo cruzado, la alimentación se pasa a través de la membrana de filtro (tangencialmente) a presión positiva en relación con el lado del producto permeado. Una proporción del material el cual es más pequeño que el tamaño de poro de la membrana pasa a través de la membrana como producto permeado o producto filtrado; el resto es retenido en el lado de alimentación de la membrana como producto retenido.

El volumen del fluido se reduce al permitir que ocurra el flujo del producto permeado. El solvente, los solutos y partículas más pequeñas que el tamaño de poro de la membrana pasan a través de la membrana, mientras que las partículas más grandes que el tamaño de poro son retenidas y concentradas de ese modo. En aplicaciones de bioprocesamiento, la concentración puede ser seguida por la diafiltración.

El término diafiltración, como se utiliza en este documento, se refiere a la dilución y concentración de nuevo de la solución o líquido, donde con el propósito de retirar de manera efectiva los componentes del producto permeado de la solución o líquido, se puede agregar solvente nuevo a la alimentación para reemplazar el volumen de producto

permeado, a la misma velocidad que el caudal de producto permeado, de tal manera que el volumen en el sistema permanezca constante. Esto es análogo al lavado de la torta de filtro para retirar componentes solubles.

### Ejemplos

Ejemplo 1:

- 5 Con el propósito de realizar un programa de optimización en la ULTRAFILTRACIÓN de una solución que contiene un anticuerpo Anti-IL-20, la solución A se diafiltró contra la solución B (5 x volumen de producto retenido) en un equipo de filtración Äktacrossflow equipado con un casete Pellicon 3, membrana Ultracel 30 K, módulo 88 cm<sup>2</sup> (Millipore).

Solución A:

100 g/L de Anti-IL20

- 10 Sacarosa 150 mM

Arg 25 mM

NaCl 25 mM

His 33 mM

pH 6.5

- 15 Solución B:

Arg 25 mM

NaCl 25 mM

His 33 mM

pH 6.5

- 20 El equipo Äktacrossflow también se equipó con un intercambiador de calor (Exergy, serie 17 modelo 00402) utilizado para regular la temperatura del material retenido a 45 °C. Delta P (Pin-Pout) fue 2 bares y TMP (presión Transmembrana) fue 1 bar. Después de la diafiltración, el producto retenido se concentró con la ultrafiltración de acuerdo con la Tabla 1.

- 25 El efecto de la diafiltración fue que la apariencia de la solución se tornó de clara a lechosa, indicando la precipitación de la proteína.

El factor de concentración es un número el cual es recíproco a la reducción de volumen del producto retenido durante la concentración por diafiltración. Cuando el volumen de producto retenido se reduce a 1/2, el factor de concentración será 2. Este factor se utiliza para determinar la concentración calculada de mAb por medio de la multiplicación con la concentración original:  $108.3 \times 2 = 216.6$ .

- 30 Durante la siguiente concentración de soluciones anti-IL20 en la solución B con y sin sacarosa 150 mM el contenido de mAb se midió y se comparó con el contenido calculado (calculado por medio del factor de concentración), Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de concentración calculada contra concentración medida (real), con y sin la adición de sacarosa.

Concentración con sacarosa (Solución A)			Concentración sin sacarosa (Solución B)		
Concentración calculada (g/L)	Concentración medida (g/L)	Factor de Concentración	Concentración calculada (g/L)	Concentración medida (g/L)	Factor de Concentración
108,3	108,5*	1	91,8	77,8*	1

## ES 2 622 558 T3

216,6	215,8	2	209,3	136,7	2,28
270,8	243,1	2,5	229,5	145,3	2,5
359,55	303,3	3,32	275,4	162,6	3
			325,0	183,7	3,54
			372,7	197,9	4,06

(\*El hecho de que exista una diferencia entre las concentraciones medidas y calculadas ya con un factor de concentración 1 es resultado de la precipitación durante la diafiltración).

Esto muestra una diferencia entre las concentraciones calculadas contra las concentraciones medidas, lo cual se podría explicar por la creación de una capa acumulada de proteína extremadamente concentrada en la superficie de la membrana, puede ser proteína contaminada o precipitada o agregados de proteína. La diferencia es mucho más grande cuando no está presente la sacarosa.

### 5 Ejemplo 2:

Con el propósito de investigar el efecto de la adición de sacarosa antes de la ultrafiltración, sobre la formación de HMWP (Proteínas de Peso Molecular Alto: agregados) durante la ultrafiltración, el contenido de producto retenido de HMWP se midió incluyendo algunas muestras de lavado del casete después de vaciar el producto como se puede observar las fracciones de lavado tienen concentraciones sustancialmente más bajas que el producto retenido original. El contenido de HMWP de la fracción de lavado es interesante debido a que muestra la constitución del gel - o el material de la capa acumulada el cual no se muestra en el producto retenido. El resultado total es que el material con sacarosa presente durante la concentración tiene un contenido más bajo de HMWP de acuerdo con la teoría respecto a que la sacarosa protege al mAb.

15 El contenido de mAb se determinó por medio de la absorción a UV280 nm con un instrumento NanoDrop 2000CMR (Thermo Scientific) y la HMWP se determinó por medio de un método SEC (Cromatografía de Exclusión de Tamaño) HPLC analítica con una columna TSK Gel G3000SW<sub>XL</sub> 7.8x300 mm.

Tabla 2. Contenido de HMPW y concentraciones de mAb del producto retenido y porciones de lavado de la ultrafiltración de la solución B (sin sacarosa).

ID de muestra	Concentración (g/L)	HMWP (%)
Producto retenido	174	1,2
Lavado 1	108	1,2
Lavado 2	67	1,1
Lavado 3	41	1,1

20 Tabla 3. Contenido de HMPW y concentraciones de mAb del producto retenido y porciones de lavado de la ultrafiltración de la solución A (con sacarosa).

ID de muestra	Concentración (g/L)	HMWP (%)
Producto retenido	296	1,0
Lavado 1	148	1,0
Lavado 2	95	1,0
Lavado 3	59	0,9
Lavado 4	26	0,9

Se puede concluir a partir de tanto la Tabla 1 como las Tablas 2 y 3 que la correlación mejorada entre las concentraciones de producto retenido medidas y calculadas durante la concentración por ultrafiltración de la solución A y los resultados del análisis de HMWP indica que la presencia de sacarosa previene en algún grado la agregación de la proteína y la creación de una capa acumulada (o contaminación).

### 25 Ejemplo 3:

Con el propósito de investigar el efecto de la adición de sacarosa antes de la ultrafiltración, sobre la recuperación de proteínas o rendimiento del proceso, la concentración de mAb se midió en el producto retenido y las muestras del lavado del casete después de vaciar el producto.

5 El contenido de mAb se determinó por medio de la absorción a UV280 nm con un instrumento NanoDrop 2000CMR (Thermo Scientific).

La Tabla 4 muestra el rendimiento o recuperación del anticuerpo anti-IL-20 del producto retenido de la solución B y muestras del casete. El volumen de inicio fue 140 mL, con una concentración de anticuerpos de 107.45 g/L o en total 15 g de anticuerpo.

10 Tabla 4. Rendimiento del anticuerpo en el producto retenido y porciones de lavado de la ultrafiltración de la solución B sin sacarosa).

ID de muestra	Volumen (mL)	Concentración (g/L)	mAb (g)
Producto retenido	37,5	192,2	7,2
Lavado 1	22	118,9	2,6
Lavado 2	24	82,1	2,0
Lavado 3	50	48,3	2,2
Total			14,0
Rendimiento total			93,0%

La Tabla 5 muestra el rendimiento o recuperación de anticuerpo anti-IL-20 de la solución A. El volumen de partida fue 300 mL, con una concentración de anticuerpos de 107.45 g/L o 32.2 g de anticuerpo en total.

Tabla 5. Rendimiento del anticuerpo en el producto retenido y porciones de lavado de la ultrafiltración de la solución A (con sacarosa).

ID de muestra	Volumen (mL)	Concentración (g/L)	mAb (g)
Producto retenido	68	303,28	20,6
Lavado 1	24	90	2,2
Lavado 2	23	171,1	3,9
Lavado 3	23	105,5	2,4
Lavado 4	23	66	1,5
Lavado 5	50	29,8	1,5
Total			32,2
Rendimiento total			99,8%

15 Lo siguiente es una lista no limitante de modalidades de la presente invención.

1. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.

20 2. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de proteínas calculada o estimada y una concentración de proteínas medida real en un producto retenido de la ultrafiltración de proteínas sumamente concentrado, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 g/L y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.

3. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de proteínas calculada o estimada y una concentración de proteínas medida real en un producto retenido de la ultrafiltración de proteínas sumamente

concentrado a menos de 15 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.

- 5 4. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de proteínas calculada o estimada y una concentración de proteínas medida real en un producto retenido de la ultrafiltración de proteínas sumamente concentrado a menos de 20 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 10 5. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de proteínas calculada o estimada y una concentración de proteínas medida real en un producto retenido de la ultrafiltración de proteínas sumamente concentrado a menos de 25 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 15 6. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de proteínas calculada o estimada y una concentración de proteínas medida real en una ultrafiltración proteínica sumamente concentrada a menos de 30 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 20 7. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, donde la diferencia entre la concentración de proteínas calculada o estimada y la concentración de proteínas medida real en el producto retenido de la ultrafiltración sumamente concentrado es menor que 15 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 25 8. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, donde la diferencia entre la concentración de proteínas calculada o estimada y la concentración de proteínas medida, real en el producto retenido de la ultrafiltración sumamente concentrado es menor que 20 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 30 9. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, donde la diferencia entre la concentración de proteínas calculada o estimada y la concentración de proteínas medida real en el producto retenido de la ultrafiltración sumamente concentrado es menor que 25 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 35 10. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, donde la diferencia entre la concentración de proteínas calculada o estimada y la concentración de proteínas medida, real en el producto retenido de la ultrafiltración sumamente concentrado es menor que 30 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 40 11. Un método para incrementar la recuperación de una proteína por medio de la ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 45 12. Un método para incrementar la recuperación de una proteína por medio de la ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada por encima del 94 % de la cantidad total de la proteína en la solución a ser ultrafiltrada, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
13. Un método para incrementar la recuperación de una proteína por medio de la ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada por encima del 95 % de la cantidad total de la proteína en la solución a ser ultrafiltrada, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
14. Un método para incrementar la recuperación de una proteína por medio de la ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada por encima del 96 % de la cantidad total de la proteína en la solución a ser ultrafiltrada, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.



total de la proteína en la solución a ser ultrafiltrada, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.

- 5 28. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, donde la recuperación de una proteína por medio de la ultrafiltración en el producto retenido de la ultrafiltración final es superior a 60 % de la cantidad total de la proteína en la solución a ser ultrafiltrada, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
29. Un método para estabilizar una solución proteínica sumamente concentrada durante la ultrafiltración, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 10 30. Un método para estabilizar una solución proteínica sumamente concentrada durante la ultrafiltración, donde el nivel de agregados de HMWP es 1 % o inferior a 1 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 15 31. Un método para estabilizar una solución proteínica sumamente concentrada durante la ultrafiltración, donde el nivel de agregados de HMWP es inferior a 1.1 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
32. Un método para disminuir la formación de agregados de HMWP en una solución proteínica sumamente concentrada durante la ultrafiltración, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 20 33. Un método para disminuir la formación de agregados de HMWP en una solución proteínica sumamente concentrada durante la ultrafiltración a 1 % o inferior a 1 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
34. Un método para disminuir la formación de agregados de HMWP en una solución proteínica sumamente concentrada durante la ultrafiltración a menos de 1.1 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 25 35. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, donde el nivel de agregados de HMWP se mantiene en 1 % o inferior a 1 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 30 36. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, donde el nivel de agregados de HMWP se mantiene inferior a 1.1 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
37. Un método para estabilizar una solución proteínica sumamente concentrada durante la ultrafiltración, donde la formación de agregados de HMWP durante la ultrafiltración disminuye un 10 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 35 38. Un método para estabilizar una solución proteínica sumamente concentrada durante la ultrafiltración, donde la formación de agregados de HMWP durante la ultrafiltración disminuye un 20 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 40 39. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, donde la formación de agregados de HMWP disminuye un 10 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
40. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, donde la formación de agregados de HMWP disminuye un 20 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 45 41. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 40 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.

## ES 2 622 558 T3

42. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 41 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
43. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 42 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 5 44. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 43 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
45. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 44 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 10 46. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 45 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
47. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 46 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
48. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 47 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 15 49. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 48 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
50. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 49 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 20 51. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 50 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
52. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 51 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
53. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 52 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 25 54. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 53 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
55. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 54 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 30 56. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 55 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
57. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 56 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
58. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 57 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 35 59. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 58 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
60. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 59 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 40 61. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas es 60 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.

## ES 2 622 558 T3

62. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas está entre 40 g/L y 45 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
63. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas está entre 40 g/L y 50 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 5 64. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas está entre 45 g/L y 50 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
65. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas está entre 45 g/L y 55 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 10 66. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas está entre 50 g/L y 55 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
67. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas está entre 50 g/L y 60 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
68. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la concentración de proteínas está entre 55 g/L y 60 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 15 69. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega en la concentración entre 50 mM y 300 mM.
70. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 50 mM y 250 mM.
- 20 71. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 50 mM y 200 mM.
72. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 50 mM y 150 mM.
73. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 50 mM y 100 mM.
- 25 74. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 100 mM y 300 mM.
75. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 100 mM y 250 mM.
- 30 76. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 100 mM y 200 mM.
77. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 100 mM y 150 mM.
78. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 100 mM.
- 35 79. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 110 mM.
80. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 120 mM.
- 40 81. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 130 mM.

## ES 2 622 558 T3

82. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 140 mM.
83. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 150 mM.
- 5 84. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 160 mM.
85. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 175 mM.
- 10 86. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 200 mM.
87. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 225 mM.
88. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 250 mM.
- 15 89. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-68, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 300 mM.
90. Un método de ultrafiltración de una solución de anticuerpos sumamente concentrada, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 20 91. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de anticuerpos calculada o estimada y una concentración de anticuerpos medida real en un producto retenido de la ultrafiltración de anticuerpos sumamente concentrado, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 g/L y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 25 92. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de anticuerpos calculada o estimada y una concentración de anticuerpos medida real en un producto retenido de la ultrafiltración de anticuerpos sumamente concentrado a menos de 15 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 30 93. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de anticuerpos calculada o estimada y una concentración de anticuerpos medida real en un producto retenido de la ultrafiltración de anticuerpos sumamente concentrado a menos de 20 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 35 94. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de anticuerpos calculada o estimada y una concentración de anticuerpos medida real en un producto retenido de la ultrafiltración de anticuerpos sumamente concentrado a menos de 25 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
95. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de anticuerpos calculada o estimada y una concentración de anticuerpos medida real en una ultrafiltración de anticuerpos sumamente concentrada a menos de 30 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 40 96. Un método de ultrafiltración de una solución de anticuerpos sumamente concentrada, donde la diferencia entre la concentración de anticuerpos calculada o estimada y la concentración de anticuerpos medida real en el producto retenido de la ultrafiltración sumamente concentrado es inferior al 15 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.





121. Un método para disminuir la formación de agregados de HMWP en una solución de anticuerpos sumamente concentrada durante la ultrafiltración, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 5 122. Un método para disminuir la formación de agregados de HMWP en una solución de anticuerpos sumamente concentrada durante la ultrafiltración a 1 % o inferior a 1 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 10 123. Un método para disminuir la formación de agregados de HMWP en una solución de anticuerpos sumamente concentrada durante la ultrafiltración inferior a 1.1 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 15 124. Un método de ultrafiltración de una solución de anticuerpos sumamente concentrada, donde el nivel de agregados de HMWP se mantiene a 1 % o inferior a 1 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 20 125. Un método de ultrafiltración de una solución de anticuerpos sumamente concentrada, donde el nivel de agregados de HMWP se mantiene por debajo de 1.1 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 25 126. Un método para estabilizar una solución de anticuerpos sumamente concentrada durante la ultrafiltración, donde la formación de agregados de HMWP durante la ultrafiltración disminuye un 10 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 30 127. Un método para estabilizar una solución de anticuerpos sumamente concentrada durante la ultrafiltración, donde la formación de agregados de HMWP durante la ultrafiltración disminuye un 20 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 35 128. Un método de ultrafiltración de una solución de anticuerpos sumamente concentrada, donde la formación de agregados de HMWP disminuye un 10 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 40 129. Un método de ultrafiltración de una solución de anticuerpos sumamente concentrada, donde la formación de agregados de HMWP disminuye un 20 %, en donde se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de anticuerpos de la solución está entre 40 y 60 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración.
- 45 130. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 40 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
131. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 41 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
132. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 42 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
133. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 43 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
134. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 44 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
135. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 45 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
136. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 46 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.

## ES 2 622 558 T3

137. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 47 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
138. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 48 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 5 139. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 49 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
140. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 50 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 10 141. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 51 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
142. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 52 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
143. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 53 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 15 144. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 54 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
145. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 55 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 20 146. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 56 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
147. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 57 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
148. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 58 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 25 149. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 59 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
150. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos es 60 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 30 151. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos está entre 40 g/L y 45 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
152. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos está entre 40 g/L y 50 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
153. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos está entre 45 g/L y 50 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 35 154. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos está entre 45 g/L y 55 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
155. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos está entre 50 g/L y 55 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
- 40 156. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos está entre 50 g/L y 60 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.

## ES 2 622 558 T3

157. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-129, en donde la concentración de anticuerpos está entre 55 g/L y 60 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
158. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 50 mM y 300 mM.
- 5 159. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 50 mM y 250 mM.
160. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 50 mM y 200 mM.
- 10 161. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega en la concentración entre 50 mM y 150 mM.
162. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 50 mM y 100 mM.
163. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 100 mM y 300 mM.
- 15 164. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 100 mM y 250 mM.
165. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 100 mM y 200 mM.
- 20 166. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 100 mM y 150 mM.
167. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 100 mM.
168. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 110 mM.
- 25 169. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 120 mM.
170. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 130 mM.
- 30 171. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega en la concentración de 140 mM.
172. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 150 mM.
173. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 160 mM.
- 35 174. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 175 mM.
175. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 200 mM.
- 40 176. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 225 mM.

177. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 250 mM.
178. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-157, en donde la sacarosa se agrega con la concentración de 300 mM.
- 5 179. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-178, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
180. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-179, en donde el anticuerpo es del subtipo IgG4.
181. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-180, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 10 182. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-180, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
183. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 90-182, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-IL-20.
- 15 184. Un método para concentrar una proteína en una solución proteínica de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-89, para el uso en una composición farmacéutica.
185. Un método para concentrar una proteína en una solución proteínica de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-89, para el uso para la manufactura de un medicamento.
192. Un método para concentrar una solución proteínica sumamente concentrada, el cual comprende:
- 20 (a) agregar sacarosa a la solución proteínica sumamente concentrada cuando la concentración de proteínas está entre 40 g/L y 60 g/L;
- (b) concentrar la solución proteínica sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.
193. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de proteínas calculada y medida en un producto retenido de la ultrafiltración de proteínas sumamente concentrado, el cual comprende:
- 25 (a) agregar sacarosa a la solución proteínica sumamente concentrada cuando la concentración de proteínas está entre 40 g/L y 60 g/L;
- (b) concentrar la solución proteínica sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.
194. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de proteínas calculada y medida en un producto retenido de la ultrafiltración de proteínas sumamente concentrado, el cual comprende:
- 30 (a) agregar sacarosa a una solución proteínica sumamente concentrada cuando la concentración de proteínas está entre 40 g/L y 60 g/L
- (b) concentrar la solución proteínica sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.
195. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de proteínas calculada y medida a menos de 30 % en un producto retenido de la ultrafiltración de proteínas sumamente concentrado, el cual comprende:
- 35 (a) agregar sacarosa a una solución proteínica sumamente concentrada cuando la concentración de proteínas está entre 40 g/L y 60 g/L
- (b) concentrar la solución proteínica sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.

196. Un método para incrementar la recuperación de una proteína por medio de la ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, el cual comprende:

(a) agregar sacarosa a la solución proteínica sumamente concentrada cuando la concentración de proteínas está entre 40 g/L y 60 g/L

5 (b) concentrar la solución proteínica sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.

197. Un método para incrementar la recuperación de una proteína por medio de la ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada por encima del 50 % de la cantidad total de la proteína en la solución sumamente concentrada a ser ultrafiltrada, el cual comprende:

10 (a) agregar sacarosa a la solución proteínica sumamente concentrada cuando la concentración de proteínas está entre 40 g/L y 60 g/L

(b) concentrar la solución proteínica sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.

198. Un método para estabilizar una solución proteínica sumamente concentrada durante la ultrafiltración, el cual comprende:

15 (a) agregar sacarosa a la solución proteínica sumamente concentrada cuando la concentración de proteínas está entre 40 g/L y 60 g/L

(b) concentrar la solución proteínica sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.

199. Un método para suprimir la formación de HMWP durante la ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, el cual comprende:

20 (a) agregar sacarosa a la solución proteínica sumamente concentrada cuando la concentración de proteínas está entre 40 g/L y 60 g/L

(b) concentrar la solución proteínica sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.

200. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada donde el nivel de HMWP es suprimido a 1 % o inferior a 1 %, el cual comprende:

25 (a) agregar sacarosa a la solución proteínica sumamente concentrada cuando la concentración de proteínas está entre 40 g/L y 60 g/L

(b) concentrar la solución proteínica sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.

201. Un método para concentrar una solución de anticuerpos sumamente concentrada, el cual comprende:

(a) agregar sacarosa a la solución de anticuerpos sumamente concentrada cuando la concentración de anticuerpos está entre 40 g/L y 60 g/L;

30 (b) concentrar la solución de anticuerpos sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.

202. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de anticuerpos calculada y medida en un producto retenido de la ultrafiltración de anticuerpos sumamente concentrado, el cual comprende:

(a) agregar sacarosa a la solución de anticuerpos sumamente concentrada cuando la concentración de anticuerpos está entre 40 g/L y 60 g/L;

35 (b) concentrar la solución de anticuerpos sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.

203. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de anticuerpos calculada y medida en un producto retenido de la ultrafiltración de anticuerpos sumamente concentrado, el cual comprende:

- (a) agregar sacarosa a una solución de anticuerpos sumamente concentrada cuando la concentración de anticuerpos está entre 40 g/L y 60 g/L
- (b) concentrar la solución de anticuerpos sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.
- 5 204. Un método para disminuir la diferencia entre una concentración de anticuerpos calculada y medida a menos de 30 % en un producto retenido de la ultrafiltración de anticuerpos sumamente concentrado, el cual comprende:
- (a) agregar sacarosa a una solución de anticuerpos sumamente concentrada cuando la concentración de anticuerpos está entre 40 g/L y 60 g/L
- (b) concentrar la solución de anticuerpos sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.
- 10 205. Un método para incrementar la recuperación de un anticuerpo por medio de la ultrafiltración de una solución de anticuerpos sumamente concentrada, el cual comprende:
- (a) agregar sacarosa a la solución de anticuerpos sumamente concentrada cuando la concentración de anticuerpos está entre 40 g/L y 60 g/L
- (b) concentrar la solución de anticuerpos sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.
- 15 206. Un método para incrementar la recuperación de un anticuerpo por medio de la ultrafiltración de una solución de anticuerpos sumamente concentrada por encima del 50 % de la cantidad total del anticuerpo en la solución proteínica sumamente concentrada a ser ultrafiltrada, el cual comprende:
- (a) agregar sacarosa a la solución de anticuerpos sumamente concentrada cuando la concentración de anticuerpos está entre 40 g/L y 60 g/L
- (b) concentrar la solución de anticuerpos sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.
- 20 207. Un método para estabilizar una solución de anticuerpos sumamente concentrada durante la ultrafiltración, el cual comprende:
- (a) agregar sacarosa a la solución de anticuerpos sumamente concentrada cuando la concentración de anticuerpos está entre 40 g/L y 60 g/L
- b) concentrar la solución de anticuerpos sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.
- 25 208. Un método para suprimir la formación de HMWP durante la ultrafiltración de una solución de anticuerpos sumamente concentrada, el cual comprende:
- (a) agregar sacarosa a la solución de anticuerpos sumamente concentrada cuando la concentración de anticuerpos está entre 40 g/L y 60 g/L
- (b) concentrar la solución de anticuerpos sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.
- 30 209. Un método de ultrafiltración donde el nivel de HMWP es suprimido a 1 % o inferior a 1 %, el cual comprende:
- (a) agregar sacarosa a la solución de anticuerpos sumamente concentrada cuando la concentración de anticuerpos está entre 40 g/L y 60 g/L
- (b) concentrar la solución de anticuerpos sumamente concentrada por medio de la ultrafiltración.
- 35 210. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 192-209, en donde la concentración de proteínas o anticuerpos esta entre 45 g/L y 55 g/L cuando se agrega sacarosa a la solución.
211. Un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 192-210, en donde la sacarosa se agrega con la concentración entre 100 mM y 300 mM.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, caracterizado porque se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 150 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración, y caracterizado porque la diferencia entre la concentración calculada de proteínas y la concentración medida de proteínas en el producto retenido de la ultrafiltración sumamente concentrado disminuye.
2. Un método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la diferencia entre la concentración calculada de proteínas y la concentración medida de proteínas en el producto retenido de la ultrafiltración sumamente concentrado es menor que 30 %.
- 10 3. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, caracterizado porque se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 150 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración y donde el nivel de agregados de HMPW es de 1% o inferior a 1% en el producto retenido de la ultrafiltración sumamente concentrado.
- 15 4. Un método de ultrafiltración de una solución proteínica sumamente concentrada, caracterizado porque se agrega sacarosa a la solución cuando la concentración de proteínas de la solución está entre 40 y 150 g/L antes de la concentración adicional por medio de la ultrafiltración y donde la recuperación de la proteína durante la ultrafiltración se incrementa.
- 20 5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque la recuperación de la proteína durante la ultrafiltración es 94 % o superior, de la cantidad total de una proteína en la solución proteínica sumamente concentrada a ser ultrafiltrada.
6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la proteína es un anticuerpo IgG4.