

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 079**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2012 PCT/US2012/030265**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12134987**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2012 E 12763521 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2697369**

54 Título: **Procedimientos de purificación de proteínas novedosos**

30 Prioridad:

25.03.2011 US 201161467897 P

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

05.10.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BROWN, ARICK;
JI, JUNYAN;
LIU, JUN y
WANG, YUCHANG JOHN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 685 079 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

Procedimientos de purificación de proteínas novedosos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la purificación de proteínas. Más específicamente, la presente invención proporciona procedimientos novedosos para reducir el ensuciamiento inducido por proteínas de los filtros de membrana de ultrafiltración en procedimientos de fabricación de fármacos biológicos.

10

Antecedentes de la invención

Los virus son un contaminante potencial en los procedimientos de fabricación de fármacos biológicos, en particular en casos donde los fármacos a base de polipéptidos se derivan de cultivos celulares de mamífero o de organismos completos. En muchos casos, existen procedimientos químicos o físicos para inactivar los contaminantes víricos, pero estos procedimientos no son genéricos para todos los virus y, en algunos casos, pueden afectar a la actividad del fármaco biológico. Los parvovirus proporcionan un reto particular en su retirada en base a su resistencia general a agentes de inactivación químicos y físicos.

15

20

25

30

35

40

Los enfoques actuales para la prevención de contaminación por parvovirus de fármacos biológicos incluyen el uso de filtración con membrana de corrientes de alimentación biológicas durante el procedimiento de fabricación. Las partículas de parvovirus son pequeñas; por ejemplo, algunos parvovirus son tan pequeños como de 23 nm. Como tales, los filtros para parvovirus tienen típicamente un tamaño de poro promedio de 20 nm. Debido al tamaño de poro pequeño, estos filtros son extremadamente sensibles al ensuciamiento proteico dando como resultado el reemplazo frecuente de los filtros durante el procedimiento de fabricación, lo que contribuye significativamente al coste de procesamiento. Los procedimientos para reducir el ensuciamiento proteico de los filtros de poro pequeño incluyen el uso de un prefiltro tal como un filtro de intercambio iónico (patente de EE. UU. n.º 7.118.675; Bolton, GR *et al.* 2010 *Biotechnol. Prog.*) o pretratar el filtro de membrana con un tensioactivo no iónico (Fane, AG *et al.* 1985 *Desalination* 53:37-55; Jonsson, AS, y Jonsson, B, 1991 *J. Membrane Sci.* 56:49-76; Chen, V. *et al.* 1992 *J. Membrane Sci.* 67:249-261). Sin embargo, se ha demostrado que los resultados obtenidos con estos enfoques son incongruentes, impredecibles y pueden ser ineficaces y/o con coste prohibitivo. Otros documentos relacionados con el área de la presente invención son los documentos US2010/190965 A1, WO99/19343 A1 y WO98/10856 A1. El documento US2010/190965 A1 divulga un procedimiento para separar con exactitud monómeros de inmunoglobulina sometiendo una solución de inmunoglobulina que contiene al menos monómeros de inmunoglobulina y agregados de inmunoglobulina a filtración de flujo cruzado usando una membrana de ultrafiltración de PVDF modificada, un módulo de membrana de ultrafiltración y un aparato de filtración de flujo cruzado. En particular, se divulga un procedimiento para eliminar virus de medios que comprenden inmunoglobulinas, comprendiendo dicho procedimiento mezclar tensioactivos, polietilenglicol (PEG), dextrano y/o arginina en dichos medios y filtrar los mismos a través de una membrana con nanofiltro de PVDF. El documento WO99/19343 A1 divulga procedimientos para producir inmunoglobulinas y, en particular, inmunoglobulina anti-D sustancialmente sin virus y el producto resultante de la misma. Específicamente se proporcionan procedimientos para nanofiltración. Los procedimientos para producir inmunoglobulinas son en particular inmunoglobulina anti-D sustancialmente sin virus y el producto resultante de la misma.

45

50

Además de la retirada vírica, se pueden usar filtros de membrana para retirar agregados de proteínas de fármacos biológicos. Por ejemplo, las soluciones acuosas de anticuerpos pueden contener agregados de anticuerpos que se deben retirar antes de su administración a un paciente para evitar respuestas tóxicas potenciales. Estos agregados de proteínas contribuyen al ensuciamiento del filtro de membrana así como a la reducción de los rendimientos globales del fármaco biológico.

Por tanto, existe una necesidad continua de procedimientos mejores y más económicos para la filtración de soluciones biológicas para retirar contaminantes víricos potenciales y reducir los agregados de proteínas. La invención proporcionada en el presente documento aborda estas necesidades y proporciona beneficios adicionales.

55 Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona procedimientos de reducción del ensuciamiento de membranas de ultrafiltración en procedimientos donde se retiran partículas de virus de soluciones acuosas de proteína añadiendo un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico directamente a una corriente de alimentación de proteína acuosa antes de la ultrafiltración. Los procedimientos proporcionan las ventajas de potenciación del rendimiento en masa de la membrana de ultrafiltración e incrementar la vida útil de la membrana de ultrafiltración. Además, la invención proporciona procedimientos para reducir o evitar la formación de agregados en soluciones acuosas de proteína.

60

65

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos de reducción del ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración en un procedimiento en el que se retiran partículas de virus de una solución acuosa que comprende partículas de virus y al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento las etapas de a) añadir a dicha

5 solución acuosa un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico, seleccionado del grupo que consiste en un polietilenglicol, un derivado de celulosa, arginina y un dextrano, y b) filtrar dicha solución acuosa que comprende dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a través de dichas membranas de ultrafiltración, en el que la presencia de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico en dicha solución acuosa reduce el ensuciamiento de dicha membrana de ultrafiltración.

10 En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos de potenciación de la eficacia del rendimiento de filtración de una membrana de ultrafiltración en un procedimiento en el que se retiran partículas de virus de una solución acuosa que comprende partículas de virus y al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento añadir un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico seleccionado del grupo que consiste en un polietilenglicol, un derivado de celulosa, arginina y un dextrano a dicha solución acuosa antes de filtrar dicha solución acuosa a través de dichas membranas de ultrafiltración, en el que la presencia de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico en dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en comparación con la ausencia de dicho tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico.

15 En un aspecto, la invención proporciona procedimientos para disociar agregados de polipéptidos o reducir la formación de agregados de polipéptidos en una corriente de alimentación de ultrafiltración que comprende una solución acuosa que comprende al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento añadir un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico seleccionado del grupo que consiste en un polietilenglicol, un derivado de celulosa, arginina y un dextrano a dicha solución acuosa. En algunos modos de realización, el procedimiento incluye además una etapa de ultrafiltración.

20 En un aspecto, la invención proporciona procedimientos de reducción del ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración en un procedimiento en el que se retiran partículas de virus de una solución acuosa que comprende dichas partículas de virus y al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento las etapas de a) filtrar dicha solución acuosa a través de un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en una o más capas de filtros de profundidad de adsorción y una o más capas de membranas microporosas cargadas o con superficie modificada; b) añadir un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico seleccionado del grupo que consiste en un polietilenglicol, un derivado de celulosa, arginina y un dextrano a dicha solución acuosa; y c) filtrar dicha solución acuosa que comprende dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a través de dichas membranas de ultrafiltración, en el que la presencia de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico en dicha solución acuosa reduce el ensuciamiento de dicha membrana de ultrafiltración.

25 En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos de reducción del ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración en un procedimiento en el que se retiran partículas de virus de una solución acuosa que comprende dichas partículas de virus y al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento las etapas de a) añadir un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico seleccionado del grupo que consiste en un polietilenglicol, un derivado de celulosa, arginina y un dextrano a dicha solución acuosa, b) filtrar dicha solución acuosa a través de un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en una o más capas de filtros de profundidad de adsorción y una o más capas de membranas microporosas cargadas o con superficie modificada; y c) filtrar dicha solución acuosa que comprende dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a través de dichas membranas de ultrafiltración, en el que la presencia de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico en dicha solución acuosa reduce el ensuciamiento de dicha membrana de ultrafiltración.

35 En algunos aspectos de la divulgación explicada anteriormente, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen, pero no se limitan a, polisorbato 20, Triton® X-100, Triton® X-405, laurmacrogol y polisorbato 80. En algunos modos de realización de cualquiera de los aspectos de la invención explicada anteriormente, el tensioactivo no iónico es polisorbato 20 o Triton® X-100.

40 En algunos aspectos de la divulgación explicada anteriormente, el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a la solución acuosa a una concentración de 1-10.000 ppm. En algunos modos de realización, el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a la solución acuosa a una concentración de 10-200 ppm.

45 En algunos modos de realización de cualquiera de los aspectos de la invención explicada anteriormente, la membrana de ultrafiltración es una membrana de retención de parvovirus. En algunos modos de realización, la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de menos de aproximadamente 100 nm o menos. En algunos modos de realización, la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de aproximadamente 20 nm o menos. En algunos modos de realización, la etapa de filtrar la solución acuosa es por filtración de flujo normal.

50 En algunos modos de realización de cualquiera de los aspectos de la invención explicada anteriormente, la proteína en la solución acuosa es un anticuerpo. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o humanizado.

55 En algunos modos de realización de cualquiera de los aspectos de la invención explicada anteriormente, la adición del tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 10 %. En algunos modos de

realización, la adición del tensioactivo o el agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 50 %.

5 En algunos modos de realización de cualquiera de los aspectos de la invención explicada anteriormente, las partículas de virus son partículas de parvovirus.

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1 muestra el efecto del polisorbato 20 sobre la ultrafiltración de una solución acuosa que comprende un anticuerpo anti-PDL1. Se añadió polisorbato 20 a la corriente de alimentación acuosa que contenía anticuerpo a 0 ppm (1), 20 ppm (2), 50 ppm (3), 70 ppm (4), 100 ppm (5) y 1000 ppm (6). Se representa el rendimiento de la membrana de ultrafiltración (VF) en g/m² frente a la presión transmembranaria en libras por pulgada cuadrada.

15 La figura 2 muestra el efecto del polisorbato 20 sobre la ultrafiltración de una solución acuosa que comprende un anticuerpo anti-VEGF. Se añadió polisorbato 20 a la corriente de alimentación acuosa que contenía anticuerpo a 0 ppm (1), 20 ppm (2), 100 ppm (3), 1000 ppm (4) y 10000 ppm (5). Se representa el rendimiento de la membrana de ultrafiltración (VF) en g/m² frente a la presión transmembranaria en libras por pulgada cuadrada.

20 La figura 3 muestra el efecto del polisorbato 20 sobre la ultrafiltración de una solución acuosa que comprende un anticuerpo anti-MUC16. Se añadió polisorbato 20 a la corriente de alimentación acuosa que contenía anticuerpo a 0 ppm (1), 20 ppm (2), 100 ppm (3) y 1000 ppm (4). Se representa el rendimiento de la membrana de ultrafiltración (VF) en g/m² frente a la presión transmembranaria en libras por pulgada cuadrada.

25 La figura 4 muestra el efecto de ningún aditivo (1), 1000 ppm de polisorbato 20 (2) o 1000 ppm de Triton® X-100 (3) sobre la ultrafiltración de una solución acuosa que comprende un anticuerpo anti-DR5. Se representa el rendimiento de la membrana de ultrafiltración (VF) en g/m² frente a la presión transmembranaria en libras por pulgada cuadrada.

30 La figura 5 muestra el efecto de Triton® X-100 sobre la ultrafiltración de una solución acuosa que comprende un anticuerpo anti-PDL1. Se añadió Triton® X-100 a la corriente de alimentación acuosa que contenía anticuerpo a 0 ppm (1), 20 ppm (2), 200 ppm (3), 300 ppm (4) y 1000 ppm (5). Se representa el rendimiento de la membrana de ultrafiltración (VF) en g/m² frente a la presión transmembranaria en libras por pulgada cuadrada.

35 La figura 6 muestra el efecto de Triton® X-100 sobre la ultrafiltración de una solución acuosa que comprende un anticuerpo anti-VEGF. Se añadió Triton® X-100 a la corriente de alimentación acuosa que contenía anticuerpo a 0 ppm (1), 300 ppm (2) y 1000 ppm (3). Se representa el rendimiento de la membrana de ultrafiltración (VF) en g/m² frente a la presión transmembranaria en libras por pulgada cuadrada.

40 La figura 7 muestra el efecto de Triton® X-100 sobre la ultrafiltración de una solución acuosa que comprende un anticuerpo anti-MUC16. Se añadió Triton® X-100 a la corriente de alimentación acuosa que contenía anticuerpo a 0 ppm (1), 150 ppm (2), 1000 ppm (3) y 2000 ppm (4). Se representa el rendimiento de la membrana de ultrafiltración (VF) en g/m² frente a la presión transmembranaria en libras por pulgada cuadrada.

45 La figura 8 muestra el efecto de polisorbato 20 o Triton® X-100, sin o en combinación con una etapa de prefiltración previa, sobre la ultrafiltración de una solución acuosa que comprende un anticuerpo anti-PDL1. Se investigaron los siguientes, sin tensioactivo o etapa de prefiltración (1), prefiltración usando un prefiltro de intercambio catiónico Mustang S® (2), 1000 ppm de polisorbato 20 (3), prefiltración con un prefiltro de intercambio catiónico Mustang S® más 1000 ppm de polisorbato 20 (4), 1000 ppm de Triton® X-100 (5) y prefiltración con un prefiltro de intercambio catiónico Mustang S® más 1000 ppm de Triton® X-100 (6). Se representa el rendimiento de la membrana de ultrafiltración (VF) en g/m² frente a la presión transmembranaria en libras por pulgada cuadrada.

50 La figura 9 muestra el efecto de polisorbato 20 o Triton® X-100, sin o en combinación con una etapa de prefiltración previa, sobre la ultrafiltración de una solución acuosa que comprende un anticuerpo anti-VEGF. Se investigaron los siguientes, sin tensioactivo o etapa de prefiltración (1), 1000 ppm de polisorbato 20 (2), 1000 ppm de Triton® X-100 (3), prefiltración usando un prefiltro de intercambio catiónico Mustang S® (4), prefiltración con un prefiltro de intercambio catiónico Mustang S® más 1000 ppm de polisorbato 20 (5) y prefiltración con un prefiltro de intercambio catiónico Mustang S® más 1000 ppm de Triton® X-100 (6). Se representa el rendimiento de la membrana de ultrafiltración (VF) en g/m² frente a la presión transmembranaria en libras por pulgada cuadrada.

60 La figura 10 muestra el efecto de diversos tensioactivos o agentes no tensioactivos, no iónicos sobre la ultrafiltración de una solución acuosa que comprende un anticuerpo anti-PDL1. Se investigaron los siguientes, sin aditivo (1), 1000 ppm de octil-β-D-glucopiranosido (2), 1000 ppm de PEG6000 (3), prefiltración usando un prefiltro de intercambio catiónico Mustang S® (4), L-arginina HCl 200 mM (5), 1000 ppm de Triton® X-405 (6), 1000 ppm de lauromacrogol (Brij® 35) (7), 1000 ppm de polisorbato 20 (8) o 1000 ppm de Triton® X-100 (9). Se representa el rendimiento de la membrana de ultrafiltración (VF) en g/m² frente a la presión transmembranaria en libras por pulgada cuadrada.

65

La figura 11 muestra el efecto de diversos tensioactivos o agentes no tensioactivos, no iónicos sobre la ultrafiltración de una solución acuosa que comprende un anticuerpo anti-VEGF. Se investigaron los siguientes, sin aditivo (1), 1000 ppm de estearato de PEG8 (2), 1000 ppm de dextrano LMW PEG 6000 (3), 1000 ppm de PEG20 sorbitano (4), 1000 ppm de laurato de PEG8 (5), 1000 ppm de polisorbato 80 (6), 1000 ppm de polisorbato 20 (7), 1000 ppm de lauromacrogol (Brij35) (8), prefiltración usando un prefiltro de intercambio catiónico Mustang S® (9) o 1000 ppm de Triton® X-100 (10). Se representa el rendimiento de la membrana de ultrafiltración (VF) en g/m² frente a la presión transmembranaria en libras por pulgada cuadrada.

La figura 12 muestra el efecto del pretratamiento de una membrana de ultrafiltración con polisorbato 20 antes de la ultrafiltración de una solución acuosa de anticuerpo anti-VEGF. En una muestra, se pretrató la membrana de ultrafiltración con polisorbato 20 pero no se añadió ningún tensioactivo directamente a la materia prima acuosa (2). En otra muestra, se añadieron 1000 ppm de polisorbato 20 directamente a la materia prima acuosa, pero no se pretrató la membrana de ultrafiltración con el tensioactivo (3). En una muestra de control, no se añadió el tensioactivo directamente a la corriente de alimentación y no se pretrató el filtro de parvovirus con el tensioactivo (1). Se representa el rendimiento de la membrana de ultrafiltración (VF) en g/m² frente a la presión transmembranaria en libras por pulgada cuadrada.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona procedimientos de reducción del ensuciamiento de membranas de ultrafiltración en procedimientos donde se retiran virus de soluciones acuosas que comprenden partículas de virus y al menos una proteína añadiendo un tensioactivo o determinados agentes no tensioactivos, no iónicos a la solución acuosa antes de filtrar la solución acuosa a través de una membrana de ultrafiltración. Los inventores han hecho el descubrimiento inesperado de que añadiendo un tensioactivo o determinados agentes no tensioactivos, no iónicos directamente a la solución acuosa se reduce el ensuciamiento de las membranas de ultrafiltración en mayor medida en comparación con los procedimientos donde las membranas de ultrafiltración se pretratan con un tensioactivo antes de la filtración. Esta reducción en el ensuciamiento de las membranas de ultrafiltración se puede lograr con una variedad de tensioactivos; por ejemplo, pero sin limitarse a, polisorbato 20 y Triton® X-100, o agentes no tensioactivos, no iónicos; por ejemplo, pero sin limitarse a, polietilenglicoles, dextranos, arginina o determinadas metil- o etilcelulosas. En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos de incremento del rendimiento de las membranas de ultrafiltración en un procedimiento por el que se retiran partículas víricas de una corriente de alimentación acuosa añadiendo un tensioactivo o determinado agente no tensioactivo, no iónico directamente a la corriente de alimentación. En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos de incremento de la semivida de una membrana de ultrafiltración en un procedimiento por el que se retiran partículas víricas de una corriente de alimentación acuosa añadiendo un tensioactivo o determinado agente no tensioactivo, no iónico directamente a la corriente de alimentación.

En algunos aspectos de la invención, se añade un tensioactivo o determinado agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa que comprende partículas de virus y al menos una proteína en un sistema donde se pasa la solución acuosa a través de un prefiltro antes de la ultrafiltración. En algunos modos de realización, se añade un tensioactivo o determinado agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa antes del paso a través del prefiltro. En algunos modos de realización, se añade un tensioactivo o determinado agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa después del paso a través de un prefiltro pero antes de la ultrafiltración.

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para disociar agregados de proteínas o polipéptidos en corrientes de alimentación de ultrafiltración añadiendo un tensioactivo o determinado agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa antes de una etapa de ultrafiltración. En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para reducir la formación de agregados de proteínas o polipéptidos en corrientes de alimentación de ultrafiltración añadiendo un tensioactivo o determinados agentes no tensioactivos, no iónicos a la solución acuosa antes de una etapa de ultrafiltración. En algunos modos de realización, se pasa la solución acuosa a través de un prefiltro antes de la ultrafiltración.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los significados de todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento son los que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Singleton, *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 3.^a ed., John Wiley and Sons, New York (2002), y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, N.Y. (1991) proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos usados en la presente invención. Se debe entender que la presente invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos, ya que estos pueden variar. Un experto en la técnica apreciará también que cualquier procedimiento y material similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar también para practicar o probar la invención.

La "ultrafiltración" es una forma de filtración con membrana en la que la presión hidrostática fuerza un líquido contra una membrana semipermeable. Se retienen los sólidos y solutos suspendidos de alto peso molecular, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana. En algunos ejemplos, las membranas

de ultrafiltración tienen tamaños de poro en el intervalo de 1 a 100 nm. Los términos "membrana de ultrafiltración" y "filtro de ultrafiltración" se pueden usar de manera intercambiable.

5 Un "filtro de retención de virus", "filtro de virus", "membrana de virus" o "membrana de retención de virus" es un tipo de filtro/membrana de ultrafiltración usado para la retirada en base al tamaño de virus de soluciones acuosas que contienen partículas de virus. En particular, una membrana de retención de virus tiene un tamaño de poro suficiente para retener el virus de interés, mientras que permite aún que la proteína monomérica pase a través.

10 Un "filtro de retención de parvovirus", "filtro de parvovirus", "membrana de parvovirus" o "membrana de retención de parvovirus" es un tipo de filtro/membrana de ultrafiltración usado para la retirada en base al tamaño de parvovirus de soluciones acuosas que contienen partículas de parvovirus. En particular, una membrana de retención de parvovirus tiene un tamaño de poro pequeño; por ejemplo, en algunos casos, 20 nm, para retirar partículas víricas pequeñas, tales como partículas de parvovirus que pueden ser tan pequeñas como de 23 nm de diámetro.

15 Un "tensioactivo" o "agente tensioactivo" es un compuesto, típicamente (pero no necesariamente) un compuesto orgánico, que contiene tanto grupos hidrófobos como hidrófilos, y por tanto es semisoluble tanto en disolventes orgánicos como acuosos. Los tensioactivos pueden ser no iónicos, catiónicos o aniónicos.

20 Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por restos no aminoacídicos. Los términos también engloban un polímero de aminoácidos que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los términos "polipéptido" y "proteína" como se usan en el presente documento engloban específicamente anticuerpos.

30 El término "anticuerpo" o "anticuerpos" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales individuales (incluyendo agonistas, antagonistas y anticuerpos neutralizantes), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos monocatenarios, inmunoadhesinas y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad biológica o inmunológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa de manera intercambiable con anticuerpo en el presente documento.

35 La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se pueden sintetizar sin contaminarse por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención se pueden preparar por la metodología de hibridoma descrita en primer lugar por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975) o se pueden preparar usando procedimientos de ADN recombinante en células vegetales o animales, eucariotas, bacterianas (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de colecciones de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

55 Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véanse patente de EE. UU. n.º 4.81.86.56,57 y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, cercopitécido, simio superior, etc.) y secuencias de la región constante humana.

65 Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión a antígeno así como un CL y al menos los dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véanse patente de EE. UU. n.º 5.641.870, ejemplo 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Como se usa en el presente documento, el término "monómero(s)" se refiere a una única unidad de un polipéptido o proteína. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, un monómero consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras; en el caso de un anticuerpo de un brazo, un monómero consiste en una cadena pesada y una cadena ligera.

Como se usa en el presente documento, el término "agregado(s)" se refiere a cualquier multímero de un polipéptido o un fragmento de polipéptido. Por ejemplo, un agregado puede ser un dímero, trímero, tetrámero o un multímero mayor que un tetrámero, etc.

Como se usa en el presente documento, el término "partículas ensuciadoras del filtro de virus" se refiere a cualquier partícula de gran peso molecular o especie de alto peso molecular (HMWS) con un diámetro hidrodinámico similar a o mayor que la distribución del tamaño de poro de una membrana de ultrafiltración. Las partículas ensuciadoras del filtro de virus incluyen, pero no se limitan a, agregados de proteínas o polipéptidos de alto peso molecular solubles, y agregados solubles y/o insolubles de impurezas de células huésped (por ejemplo, CHOP).

El término "presión transmembranaria" se refiere a la presión aplicada diferencial desde la alimentación al lado del filtrado de la membrana calculada por $TMP [bar] = P_F - P_i$, donde P_F es la presión de alimentación, P_i es la presión del retenido, y P_f es la presión del filtrado.

El término "potenciar la eficacia del rendimiento de filtración", y similares, cuando se usa en referencia a una membrana de ultrafiltración se refiere al efecto beneficioso de un incremento en el rendimiento de volumen a través de una membrana de ultrafiltración provocado por la adición de un tensioactivo o determinados agentes no tensioactivos, no iónicos a una solución acuosa que contiene proteínas antes de la filtración de esa solución acuosa a través de la membrana de ultrafiltración.

Para su uso en el presente documento, a menos que se indique claramente de otro modo, el uso de los términos "un", "uno" y similares se refiere a uno o más.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) modos de realización que están dirigidos a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que se refiere a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X". Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

Se entiende que los aspectos y modos de realización de la invención descrita en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" aspectos y modos de realización.

Membranas de ultrafiltración

La presente invención proporciona procedimientos de reducción del ensuciamiento de las membranas de ultrafiltración en procedimientos donde se retiran partículas víricas de una solución acuosa que comprende partículas víricas y al menos una proteína. Antes de la ultrafiltración, se añaden uno o más tensioactivos o agentes no tensioactivos, no iónicos a la solución acuosa. A continuación, se pasa la solución acuosa a través de la membrana de ultrafiltración de modo que se retienen las partículas víricas por la membrana de ultrafiltración y las una o más proteínas pasan a través de la membrana. Por ejemplo, se puede usar este procedimiento en la producción a escala industrial de medicamentos de proteínas y polipéptidos. Se añade un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico a la corriente de alimentación de proteína antes de la ultrafiltración de la corriente de alimentación para reducir el ensuciamiento del filtro durante los procedimientos para retirar cualquier partícula de virus que pueda estar en la corriente de alimentación de proteína.

Se pueden formar membranas de ultrafiltración a partir de celulosa regenerada, polietersulfona, poliarilsulfonas, polisulfona, poliimida, poliamida, poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) o similares. Las membranas de ultrafiltración representativas incluyen, pero no se limitan a, membranas Viresolve[®], membranas Viresolve[®] Pro, membranas Viresolve[®] 180, membranas Viresolve[®] 70, membranas Viresolve[®] PFN, membranas Viresolve[®] NFR, membranas Retropore[™], membranas Virosart CPV, membranas Planova 75, membranas Planova 35, membranas Planova 20, membranas Planova 15N, membranas VAG 300, membranas Ultipor DVD, membranas Ultipor DV50, membranas Ultipor DV20 y filtros DVD Zeta Plus VR[™]. En algunos modos de realización, la membrana de ultrafiltración puede retirar partículas de parvovirus. En algunos modos de realización, la membrana de ultrafiltración es una membrana de retención de parvovirus.

El tamaño de poro de las membranas de ultrafiltración debe ser suficientemente pequeño para retener las partículas

de virus indeseables mientras permite que pasen las una o más proteínas en la solución acuosa a través de la membrana. En algunos modos de realización de la invención, el tamaño de poro de la membrana de ultrafiltración es menos de 10 nm, 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 125 nm, 150 nm, 175 nm o 200 nm. En algunos modos de realización, el tamaño de poro de la membrana de ultrafiltración es de 20 nm o menos.

Las membranas de ultrafiltración se pueden caracterizar por un valor de corte de peso molecular que representa el peso molecular promedio de una proteína más pequeña que se retiene por la membrana de ultrafiltración. Por ejemplo, la mayoría de las proteínas globulares con un peso molecular de más de 1000 kD se retendrán por una membrana de ultrafiltración con un valor de corte de peso molecular de 1000 kD a una tasa de un 80-90 % mientras que la mayoría de las proteínas globulares con un peso molecular de menos de 1000 kD pasarán a través de la membrana de ultrafiltración. En algunos aspectos de la divulgación, el valor de corte de peso molecular de la membrana de ultrafiltración está entre 200 kD y 1000 kD. En algunos aspectos de la divulgación, la membrana de ultrafiltración tiene un valor de corte de peso molecular de 200 kD, 300 kD, 400 kD, 500 kD, 600 kD, 700 kD, 900 kD o 1000 kD.

Se puede efectuar la filtración con una o más membranas de ultrafiltración por filtración de flujo en línea (normal) (NFF) o bien por filtración de flujo tangencial (TFF). En la NFF, se pasa la corriente de alimentación a través de una membrana y las sustancias de gran peso molecular quedan atrapadas en el filtro mientras se libera el filtrado en el otro extremo. En la TFF, la mayor parte del flujo de alimentación se desplaza tangencialmente a través de la superficie del filtro, en lugar de hacia el filtro. Como tal, se separa la torta del filtro sustancialmente por lavado durante el procedimiento de filtración, incrementando el periodo de tiempo que una unidad de filtro puede estar en funcionamiento. Se pueden suministrar membranas de ultrafiltración para cada modo de filtración en forma de cartucho (NFF), tal como filtros víricos VIREOLVE® NFF, o bien como casetes (para TFF), tales como casetes PELLICON®. En un modo de realización preferente, la filtración es filtración de flujo normal.

Se puede usar más de una membrana de ultrafiltración en los procedimientos de la invención. En algunos modos de realización, se ponen en contacto las más de una membranas de ultrafiltración con la solución acuosa en paralelo.

Las membranas de ultrafiltración utilizadas en el procedimiento de la presente invención se caracterizan por un valor de retención logarítmico (VRL, el logaritmo negativo del coeficiente de cribado) para partículas de virus y otras partículas que se incrementan monotónicamente con el diámetro de la partícula; en el intervalo de tamaño de interés para virus de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm de diámetro. Empíricamente, el VRL se incrementa continuamente con el tamaño del área proyectada de partícula (el cuadrado del diámetro de partícula). Cuando hay interés por retirar partículas de virus de pequeño tamaño de la solución de proteína; por ejemplo, parvovirus, se obtienen VRL satisfactorios de al menos aproximadamente 3. Sin embargo, se reduce el valor de corte de peso molecular, reduciendo de este modo la recuperación de proteína. Un experto en la técnica puede elegir una membrana que dé una recuperación de proteína y VRL satisfactorios. Los valores de reducción logarítmicos para partículas de virus (solutos individuales en solución, en ausencia de proteína) dependen del tamaño de partícula del virus. Por ejemplo, se puede obtener un VRL de más de aproximadamente 3 con virus de pequeño tamaño tal como parvovirus y hepatitis, y se puede obtener un VRL de más de 6 con un virus de mayor tamaño tal como el virus del sida.

Tensioactivos

Los tensioactivos que encuentran uso en la presente invención pueden ser no iónicos, aniónicos o catiónicos. Los tensioactivos no iónicos adecuados que encuentran uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, ésteres grasos de polioxietileno-sorbitano tales como polisorbatos 20, 40, 60, 65, 80, etc. (Tween®), polioxietileno-*terc*-octilfenoles tales como Triton® X-100, Triton® X-220, Triton® X-405 y Triton® X-460, polioxietileno-nonilfenol (Igepal®), éteres de polioxietileno-laurilo (Brij® 35, laurilmacrogol), éter de polioxietileno-monohehexildecilo (Cetomacrogol), éteres de polioxipropileno-polioxietileno (incluyendo polioxámeros F 38, 68, 127, 108, L62, 184, 188, poloxámero 124, 188, 237, 338, 407, etc.), polioles Pluronic®, estearato de polioxilo 40 o 50 (Myrj®), laurato de éster de polioxilo, polioxilo 35, polioxilo 40, éter oleílico de polioxilo 10, éter cetoestearílico de polioxilo 20, laurato de PEG 4-8, estearato de PEG 4-8, aceite de ricino hidrogenado, polioxietileno-aceite de ricino hidrogenado (Emulphor®) 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, octilglucósidos, ésteres de sorbitano (Span®), monolaurato de sorbitano, monopalmitato, monooleato, monoestearato, sesquioleato, trioleato, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, octilglucósidos, ésteres glicerílicos, y similares. Los tensioactivos aniónicos que encuentran uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, dodecilsulfato de sodio, sulfosuccinato graso de sodio (Aerosol®), dioctilsulfosuccinato de sodio (Aerosol OT®), sulfosuccinato de dihexilo (Aerosol MA®), desoxicolato de sodio, colato de sodio, glicocolato de sodio, caprilato de sodio, hexilsulfonato de sodio y similares. Los tensioactivos catiónicos que encuentran uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio, bromuro de cetiltrimetilamonio y similares. En algunos modos de realización, se reduce el ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración añadiendo polisorbato 20 directamente a una solución acuosa que contiene partículas de virus y al menos una proteína antes de la filtración. En algunos modos de realización, se reduce el ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración añadiendo Triton® X-100 directamente a una solución acuosa que contiene partículas de virus y al menos una proteína antes de la filtración.

Agentes no tensioactivos, no iónicos útiles en la presente invención

Los agentes no tensioactivos, no iónicos que encuentran uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, polietilenglicoles (PEG), preferentemente polietilenglicoles que tienen pesos moleculares de aproximadamente 400 a aproximadamente 6000 g/mol, derivados de celulosa (tales como, por ejemplo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa), arginina (incluyendo L-arginina, arginina HCl y similares), glucósidos de flavanona, naringina, rutina (rutinósido de quercetina) y dextranos, preferentemente dextranos que tienen pesos moleculares de aproximadamente 2000 a 20.000 Da, y similares. En algunos modos de realización, el agente no tensioactivo, no iónico no es arginina.

En algunos aspectos de la divulgación, se añade más de un agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa antes de la ultrafiltración para reducir el ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración. En otros aspectos, se puede emplear cualquier combinación de tensioactivo(s) y agente(s) no tensioactivo(s), no iónico(s).

En algunos aspectos de la divulgación, se añade más de un tensioactivo a la solución acuosa antes de la ultrafiltración para reducir el ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración. En algunos aspectos, se añade más de un tensioactivo no iónico a la solución acuosa. En otros aspectos, se añade más de un tensioactivo aniónico a la solución acuosa. En otros aspectos, se añade más de un tensioactivo catiónico a la solución acuosa. En otros aspectos, cualquier combinación de tensioactivo seleccionado de tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos y tensioactivos catiónicos; por ejemplo, un tensioactivo no iónico y un tensioactivo aniónico, un tensioactivo no iónico y un tensioactivo catiónico, o un tensioactivo aniónico y un tensioactivo catiónico.

Materia prima

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos de reducción del ensuciamiento de las membranas de ultrafiltración usadas para la retirada de partículas víricas de una materia prima producida durante la fabricación de fármacos biológicos añadiendo un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico a la materia prima antes de la ultrafiltración. En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos de incremento del rendimiento de las membranas de ultrafiltración usadas para la retirada de partículas víricas de una materia prima producida durante la fabricación de fármacos biológicos añadiendo un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico a la materia prima antes de la ultrafiltración. En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos de incremento de la semivida de una membrana de ultrafiltración usada para la retirada de partículas víricas de una materia prima producida durante la fabricación de fármacos biológicos añadiendo un tensioactivo o un agente no tensioactivo no iónico a la materia prima antes de la ultrafiltración. En algunos modos de realización, el fármaco biológico es un polipéptido o proteína. En algunos modos de realización, el fármaco biológico es una inmunoglobulina; por ejemplo, una inmunoadhesina o un anticuerpo.

Las materias primas contempladas por la invención pueden ser una solución acuosa que comprende al menos una proteína. Se pasa la materia prima a través de una membrana de ultrafiltración para retirar las partículas de virus que pueden estar en la materia prima. Se puede generar la materia prima de cualquier fuente. Por ejemplo, se puede generar la materia prima de un sistema de cultivo de células eucariotas usado de manera recombinante para producir una proteína de interés. En algunos aspectos de la divulgación, el cultivo de células eucariotas es un cultivo de células de mamífero; por ejemplo, un cultivo de células de hámster, un cultivo de células humanas, un cultivo de células de ratón y similares. En algunos aspectos de la divulgación, se genera la materia prima de una fuente *in vivo*.

En algunos aspectos de la divulgación, la materia prima que comprende una proteína de interés se ha sometido a procedimientos de separación antes de una etapa de ultrafiltración. Por ejemplo, la materia prima se puede someter a procedimientos de separación cromatográfica, procedimientos de centrifugación, procedimientos de filtración en gel y/o procedimientos de precipitación. En algunos aspectos de la divulgación, la materia prima comprende una proteína sustancialmente purificada.

La solución acuosa que comprende partículas víricas y al menos una proteína puede incluir cualquiera de los siguientes: tampones, sales, quelantes, antioxidantes, inhibidores de proteasas, conservantes y similares apropiados para la proteína de interés. El pH de la solución acuosa puede ser apropiado para la proteína de interés. En algunos aspectos, el pH de la solución acuosa varía de aproximadamente 3,4 a aproximadamente 9,0, preferentemente de aproximadamente 5,0 a 8,0, más preferentemente de aproximadamente 6,0 a 8,0. La temperatura de la corriente de alimentación puede ser apropiada para la proteína de interés. En algunos aspectos, la temperatura de la solución acuosa varía de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 30 °C, preferentemente de aproximadamente 10 °C a 25 °C. La concentración de la proteína en la solución acuosa puede variar de aproximadamente 1 g/ml a aproximadamente 200 g/l, preferentemente de aproximadamente 1 g/ml a aproximadamente 50 g/l. Un experto en la técnica puede determinar la concentración apropiada para una proteína particular.

La materia prima contendrá al menos un tipo de partícula de virus antes de la ultrafiltración. En determinados modos de realización, la partícula de virus puede ser un parvovirus, un circovirus o un retrovirus endógeno.

La materia prima contendrá al menos una proteína, que en un modo de realización es un anticuerpo. La unidad de anticuerpo tetracatenaria básica es una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetrámeras básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y por lo tanto contienen 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados se pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades tetracatenarias básicas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad tetracatenaria es en general de aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L se une a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (VH) seguido de tres dominios constantes (CH) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios CH para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene, en el extremo N, un dominio variable (VL) seguido de un dominio constante (CL) en su otro extremo. El VL se alinea con el VH y el CL se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1). Se cree que residuos aminoacídicos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. El emparejamiento de un VH y VL juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, *Basic and Clinical Immunology*, 8.^a edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.

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

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (VH) y el primer dominio constante de una cadena pesada (CH1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo proporciona un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por enlaces disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y aún puede reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab porque tienen pocos residuos adicionales en el extremo carboxiterminal del dominio CH1 incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxiterminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc; esta región también es la parte reconocida por los receptores Fc (FcR) hallados en determinados tipos de células.

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

"Fv monocatenario", también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo VH y VL conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); *Antibody Engineering*, 2.^a edición (C. Borrebaeck, ed., Oxford University Press, 1995).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con conectores cortos (de aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios VH y VL de modo que se logra el emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv de "entrecruzamiento" en los que los dominios VH y VL de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen más

completamente, por ejemplo, en el documento EP 404.097; documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Prefiltro

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos de reducción del ensuciamiento de las membranas de ultrafiltración en procedimientos donde una solución acuosa que comprende partículas víricas y al menos una proteína se someten a una etapa de prefiltro antes de la ultrafiltración. Un ejemplo de un sistema donde una materia prima se somete a una etapa de prefiltro antes de la ultrafiltración se proporciona en la patente de EE. UU. n.º 7.118.675. La presente invención proporciona procedimientos de reducción adicional en el ensuciamiento de membranas de ultrafiltración en procedimientos que incluyen un prefiltro añadiendo un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa que comprende partículas víricas y al menos una proteína antes de la ultrafiltración. En algunos modos de realización, el tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico se añade antes de una etapa de prefiltro. En otros modos de realización, el tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico se añade a la solución acuosa después de una etapa de prefiltro pero antes de la ultrafiltración. En algunos modos de realización de la invención, se usa más de una etapa de prefiltro o prefiltración. En algunos modos de realización de la invención, el tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico se añade a la solución acuosa antes de una primera etapa de prefiltro, antes de una segunda etapa de prefiltro o después de uno o más prefiltros pero antes de la ultrafiltración.

En algunos modos de realización de la invención, el prefiltro comprende una o más capas de filtros de profundidad de adsorción. En algunos modos de realización de la invención, el prefiltro comprende una o más capas de membranas microporosas cargadas o con superficie modificada. Los prefiltros adecuados representativos incluyen los formados a partir de medios fibrosos formados de fibras celulósicas, fibras sintéticas o mezclas de los mismos, tales como almohadillas MILLISTAK®+; membranas microporosas que están cargadas o bien tienen una química superficial (tal como hidrofiliidad o hidrofobicidad o una carga positiva o negativa como se enseña en las patentes de EE. UU. n.º 5.629.084 y 4.618.533) hechas de un material seleccionado del grupo que consiste en celulosa regenerada, polietersulfona, poliarilsulfona, polisulfona, poliimida, poliamida o poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF), tales como membrana cargada Durapore®, membrana hidrófoba Durapore®, membrana hidrófoba Aervent® y membrana cargada cuaternaria Intercept™ Q; y medios de cromatografía incluyendo medios de exclusión por tamaño, medios de intercambio iónico, medios hidrófobos y similares tales como medios hidrófobos Cellufine®, medios PEIL-1000, intercambio iónico Cellufine® y medios de cromatografía Matrex®. En algunos aspectos, el prefiltro es un filtro Mustang® S. En algunos aspectos, el prefiltro es un filtro A1HC. En algunos aspectos, el prefiltro es un filtro X0HC. Otros prefiltros que encuentran uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, Millipore Viresolve® Pro+, Viresolve® Shield, Intercept Q, ChromaSorb™, Pall Mustang® S, Mustang® E, Mustang® Q, Sartorius Stedim Sartobind® S, Sartobind® C, Sartobind® Q, Sartobind® D, Sartobind® STIC, Sartobind® HIC, adsorbentes de membrana Natrix Q, S, C, Pall STAX™, SUPRAcap™, filtros de profundidad SUPRAdisc 1 y SUPRAdisc 2 EKSP, EK1, EK, KS 50, KS 80, K100, K150, K200, K250, K300, K700, K900, K100 IR, K250 IR, K800 IR, K900 IR, T950, T1000, T2100, T2600, T3500, T5500, cartuchos y almohadillas para filtro de profundidad Sartorius Stedim Sartoclear® P C4, CH8, F4H, F7H, S5, S9, Begerow BECODISC, Begerow BECOPAD, Begerow BECODISC BS, filtros de profundidad CUNO ZETA Plus™ EXT ZA, EXT SP, ZA, LP, LA, AP, SP y VR.

Procedimientos para reducir el ensuciamiento de la membrana

La invención proporciona procedimientos de reducción del ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración en un procedimiento en el que se retiran partículas de virus de una solución acuosa que comprende dichas partículas de virus y al menos una proteína, comprendiendo las etapas de a) añadir un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico a dicha solución acuosa, y b) filtrar dicha solución acuosa que comprende dicho tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico a través de una o más membranas de ultrafiltración. Los inventores han descubierto que

añadiendo un tensioactivo directamente a la solución acuosa se reduce el ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración.

5 En la presente invención, la adición de un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico a la corriente de alimentación que contiene proteínas antes de la ultrafiltración potenciará la eficacia del rendimiento de filtración de la membrana de ultrafiltración en una cantidad cuantitativamente mensurable. Como se describe anteriormente, "potenciar la eficacia del rendimiento de filtración", y similares, cuando se usa en referencia a una membrana de ultrafiltración se refiere al efecto beneficioso de un incremento en el rendimiento de volumen a través de una membrana de ultrafiltración provocado por la adición de un tensioactivo o determinado(s) agente(s) no
10 tensioactivo(s), no iónico(s) a una solución acuosa que contiene proteínas antes de la filtración de esa solución acuosa a través de la membrana de ultrafiltración. Para determinar cuantitativamente el grado de potenciación de la eficacia del rendimiento de ultrafiltración como resultado de la adición de un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico a la corriente de alimentación antes de la ultrafiltración, se pueden realizar comparaciones cuantitativas filtrando la solución acuosa (ambas con y sin la adición de un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico) a
15 través de una membrana de ultrafiltración a una presión transmembranaria constante, y a continuación midiendo el volumen de rendimiento con el tiempo. En un aspecto más específico y por ejemplo, potenciar la eficacia del rendimiento de filtración de una membrana de ultrafiltración en al menos un 10 % quiere decir que el rendimiento de volumen de la membrana por unidad de tiempo y a una presión constante es al menos un 10 % mayor en presencia de un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico, que sobre la misma unidad de tiempo y la misma presión constante en ausencia de un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico.

Aunque se puede añadir el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa en cualquier cantidad útil para reducir el ensuciamiento de las membranas de ultrafiltración, en algunos aspectos se añade el
25 tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa a una concentración que varía de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 10.000 ppm. En algunos aspectos de la invención, la concentración del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico varía de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 1000 ppm. En algunos aspectos de la invención, la concentración del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico varía de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 1000 ppm. En algunos modos de realización de la invención, la concentración del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico varía de aproximadamente 10 ppm a
30 aproximadamente 200 ppm. En algunos aspectos de la invención, la concentración del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico varía de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 100 ppm. En algunos aspectos de la invención, la concentración del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico varía de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 200 ppm. En algunos aspectos de la invención, la concentración del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico varía de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 100 ppm. En algunos aspectos, el
35 tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a la solución acuosa a una concentración de menos de aproximadamente cualquiera de 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, 90 ppm, 100 ppm, 110 ppm, 120 ppm, 130 ppm, 140 ppm, 150 ppm, 160 ppm, 170 ppm, 180 ppm, 190 ppm, 200 ppm, 225 ppm, 250 ppm, 275 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm, 1000 ppm, 1250 ppm, 1500 ppm, 1750 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm, 5000 ppm, 6000 ppm, 7000 ppm, 8000 ppm, 9000 ppm, 10.000 ppm o más de aproximadamente 10.000 ppm.

En algunos modos de realización de la invención, uno o más tensioactivos o agentes no tensioactivos, no iónicos se añaden a una corriente de alimentación de una solución acuosa que comprende partículas víricas y al menos una proteína antes de la ultrafiltración. En algunos modos de realización, el uno o más tensioactivos o agentes no
45 tensioactivos, no iónicos se añaden a una solución acuosa a granel de partículas víricas y al menos una proteína antes de la ultrafiltración.

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos de reducción del ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración en un procedimiento donde se retiran partículas de virus de una solución acuosa que comprende
50 partículas de virus y al menos una proteína donde la solución acuosa se pasa a través de un prefiltro antes de la ultrafiltración. En algunos modos de realización de la invención, el procedimiento comprende las etapas de a) filtrar la solución acuosa a través del prefiltro; b) añadir un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa; y c) filtrar la solución acuosa que comprende el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico a través de una o más membranas de ultrafiltración, donde la presencia del tensioactivo en la solución acuosa reduce el
55 ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración. En otros modos de realización de la invención, el procedimiento comprende las etapas de a) añadir un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa; b) filtrar la solución acuosa a través de un prefiltro; y c) filtrar la solución acuosa que comprende el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico a través de una o más membranas de ultrafiltración, en el que la presencia del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico en la solución acuosa reduce el ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración.
60 En algunos modos de realización, el prefiltro es una o más capas de filtros de profundidad de adsorción o una o más capas de membranas microporosas cargadas o con superficie modificada. El grado de ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración se puede determinar midiendo el rendimiento de masa de la membrana.

En un aspecto, se pueden realizar comparaciones cuantitativas filtrando la solución acuosa que contiene proteínas (tanto con como sin la adición de un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico) a través de una membrana de
65 ultrafiltración a una presión transmembranaria constante, y a continuación midiendo el volumen de rendimiento con

el tiempo a través de la membrana. En general, dichas comparaciones cuantitativas se pueden realizar manteniendo una presión transmembranaria constante durante un período de tiempo predeterminado, en el que dicha presión transmembranaria constante está normalmente en el intervalo de entre aproximadamente 5 psi (34 kPa) a aproximadamente 45 psi (310 kPa), preferentemente es de 40 psi (276 kPa). Además, para dichas comparaciones cuantitativas, se puede emplear virtualmente cualquier período de tiempo predeterminado y el tiempo requerido para detectar diferencias mensurables en el volumen de rendimiento diferirá en base a determinadas variables de la solución acuosa tales como concentración de proteína, nivel de partículas ensuciadoras en la solución acuosa, etc., sin embargo, es preferente que el período de tiempo esté en el intervalo de entre aproximadamente 5 minutos y 360 minutos, preferentemente en el intervalo de entre aproximadamente 10 minutos y 240 minutos, más preferentemente 60 minutos.

En un aspecto más específico y por ejemplo, potenciar la eficacia del rendimiento de filtración de una membrana de ultrafiltración en al menos un 10 % quiere decir que el rendimiento de volumen de la membrana durante un tiempo predeterminado (como se describe anteriormente, preferentemente un período de tiempo cualquiera en el intervalo de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 360 minutos) y a una presión transmembranaria constante (preferentemente 40 psi (276 kPa)), es al menos un 10 % mayor en presencia de un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico (y/o implementación de al menos una etapa de prefiltración) que sobre la misma unidad de tiempo y la misma presión constante en ausencia del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico.

También se puede determinar el ensuciamiento de la membrana midiendo cambios en el flujo. En algunos aspectos, se mide el flujo como LMH (l/m²/h) que representa los litros de solución acuosa que pasan a través de una membrana con un área específica en una hora. Cuando una membrana se ensucia, el flujo disminuye.

También se puede determinar el ensuciamiento de la membrana midiendo el rendimiento de una proteína en una solución acuosa a una presión transmembranaria de punto final predeterminada. A medida que la membrana se ensucia, la presión transmembranaria se incrementa. En algunos casos, la presión se incrementará más allá de la capacidad de la membrana y será necesario detener la filtración. Un experto en la técnica reconocería una presión transmembranaria de punto final apropiada para una membrana de ultrafiltración dada. Una indicación de ensuciamiento de la membrana, por lo tanto, se sugeriría por un bajo rendimiento a una presión transmembranaria de punto final predeterminada; por ejemplo, 40 psi (276 kPa) para una membrana de ultrafiltración VPro. Una membrana con poco o ningún ensuciamiento daría como resultado un rendimiento alto; por ejemplo, más de 6000 g/m² a menos de o igual a 40 psi (276 kPa). En algunos casos, cuando se produce poco ensuciamiento de la membrana, puede que no se alcance la presión del punto final. En estos casos, se puede indicar la extensión del ensuciamiento de la membrana por la presión transmembranaria observada al mayor rendimiento de proteína. En algunos aspectos de la descripción, se puede evaluar el comportamiento del filtro representando la presión transmembranaria (por ejemplo, en libras por pulgada cuadrada) frente al rendimiento en masa (por ejemplo, g/m², donde m² es el área de sección transversal de la membrana). En algunos aspectos de la descripción, se puede evaluar el comportamiento del filtro representando la presión transmembranaria diferencial (por ejemplo, en libras por pulgada cuadrada diferencial) frente al rendimiento en masa (por ejemplo, g/m²).

La invención proporciona procedimientos para medir la retención de virus por membranas de ultrafiltración. Los procedimientos para medir partículas de virus son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos, hibridación de ácidos nucleicos víricos, PCR, ensayos de valoración víricos y similares. El valor de retención logarítmico (VRL) se puede medir comparando la cantidad de virus en la materia prima de la solución acuosa antes de la ultrafiltración con la cantidad de virus en el permeado de la ultrafiltración. En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para reducir el ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración añadiendo un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico a una solución acuosa de virus y al menos una proteína donde al menos tres trozos del virus en la solución acuosa se retienen por la membrana de ultrafiltración. En algunos modos de realización de la invención, se añade un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico a una solución acuosa que comprende virus y al menos una proteína en la que se reduce el ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración y en la que la retención vírica por la membrana de ultrafiltración permanece esencialmente sin cambios.

Procedimientos para disociar agregados de proteínas o reducir la formación de agregados de proteínas

En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos para disociar agregados de proteínas y/o para reducir la agregación de proteínas en una corriente de alimentación de ultrafiltración que comprende una solución acuosa que comprende al menos una proteína. El procedimiento comprende añadir un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa. En algunos modos de realización, la disociación de la agregación de proteínas o la reducción en la formación de agregados de proteínas puede reducir el ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración. Un agregado se refiere a cualquier multímero de un polipéptido o un fragmento de polipéptido (por ejemplo, un dímero, un trímero, un tetrámero o un multímero mayor que un tetrámero).

En algunos aspectos de la invención, la adición de un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico puede reducir la agregación de proteínas en una solución acuosa que contiene proteínas en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos

un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 %, cuando se compara con la cantidad de agregación de proteínas presente en la misma solución acuosa que carece del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico. La determinación cuantitativa y la comparación de la cantidad de agregación de proteínas en soluciones acuosas que carecen frente a las que contienen un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se puede realizar usando técnicas bien conocidas en la técnica.

5

En algunos aspectos de la invención, la adición de un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico puede reducir el número promedio de agregados de proteínas en una solución acuosa en al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, cuando se compara con el número promedio de agregados de proteínas presentes en la misma solución acuosa que no contiene tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico. La determinación cuantitativa y la comparación del número promedio de agregados de proteínas en soluciones acuosas que carecen frente a las que contienen un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se pueden realizar usando técnicas bien conocidas en la técnica.

10

En algunos aspectos de la invención, la adición de un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico puede reducir el tamaño promedio del agregado de proteínas en una solución acuosa en aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, cuando se compara con el tamaño promedio de agregado de proteínas presente en la misma solución acuosa que carece del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico. La determinación cuantitativa y la comparación del tamaño promedio del agregado de proteínas en soluciones acuosas que carecen frente a las que contienen un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico se pueden realizar usando técnicas bien conocidas en la técnica. En algunos aspectos, el tamaño promedio del agregado de proteínas se reduce en al menos aproximadamente cualquiera de las cantidades mencionadas anteriormente.

15

20

Aunque el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se puede añadir a la solución acuosa en cualquier cantidad útil para disociar los agregados de proteínas existentes y/o para evitar la formación de nuevos agregados de proteínas, en algunos aspectos el tensioactivo o agente no tensioactivo no iónico se añade a la solución acuosa a una concentración que varía de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 10.000 ppm. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico varía de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 1000 ppm. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico varía de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 1000 ppm. En algunos modos de realización de la invención, la concentración del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico varía de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 200 ppm. En algunos aspectos de la invención, la concentración del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico varía de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 100 ppm. En algunos aspectos de la invención, la concentración del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico varía de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 200 ppm. En algunos aspectos de la invención, la concentración del tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico varía de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 100 ppm. En algunos aspectos, el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a la solución acuosa a una concentración de menos de 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, 90 ppm, 100 ppm, 110 ppm, 120 ppm, 130 ppm, 140 ppm, 150 ppm, 160 ppm, 170 ppm, 180 ppm, 190 ppm, 200 ppm, 225 ppm, 250 ppm, 275 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm, 1000 ppm, 1250 ppm, 1500 ppm, 1750 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm, 5000 ppm, 6000 ppm, 7000 ppm, 8000 ppm, 9000 ppm, 10.000 ppm o más de 10.000 ppm.

30

35

40

En algunos aspectos de la invención, los tensioactivos que encuentran uso para disociar los agregados de proteínas existentes y/o evitar la formación de agregados de proteínas en soluciones acuosas que contienen proteínas pueden ser no iónicos, aniónicos o catiónicos. Los tensioactivos no iónicos adecuados que encuentran uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, ésteres grasos de polioxietileno-sorbitano tales como polisorbatos 20, 40, 60, 65, 80, etc. (Tween®), polioxietileno-*terc*-octilfenoles tales como Triton® X-100, Triton® X-220, Triton® X-405 y Triton® X-460, polioxietileno-nonilfenol (Igepal®), éteres de polioxietileno-laurilo (Brij® 35, laurilmacrogol), éter de polioxietileno-monohexildecilo (Cetomacrogol), éteres de polioxipropileno-polioxietileno (incluyendo polioxámeros F 38, 68, 127, 108, L62, 184, 188, poloxámero 124, 188, 237, 338, 407, etc.), polioles Pluronic®, estearato de polioxilo 40 o 50 (Myrj®), laurato de éster de polioxilo, polioxilo 35, polioxilo 40, éter oleílico de polioxilo 10, éter cetoestearílico de polioxilo 20, laurato de PEG 4-8, estearato de PEG 4-8, aceite de ricino hidrogenado, polioxietileno-aceite de ricino hidrogenado (Emulphor®) 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, octilglucósidos, ésteres de sorbitano (Span®), monolaurato de sorbitano, monopalmitato, monooleato, monoestearato, sesquioleato, trioleato, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, octilglucósidos, ésteres glicéricos, y similares. Los tensioactivos aniónicos que encuentran uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, dodecilsulfato de sodio, sulfosuccinato graso de sodio (Aerosol®), dioctilsulfosuccinato de sodio (Aerosol OT®), sulfosuccinato de dihexilo (Aerosol MA®), desoxicolato de sodio, colato de sodio, glicocolato de sodio, caprilato de sodio, hexilsulfonato de sodio y similares. Los tensioactivos catiónicos que encuentran uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio, bromuro de cetiltrimetilamonio y similares.

55

60

En algunos aspectos de la divulgación, se añade más de un tensioactivo a la solución acuosa para disociar agregados de proteínas preexistentes y/o para evitar la formación de agregados de proteínas en una solución que

65

contiene proteínas. En algunos aspectos, se añade más de un tensioactivo no iónico a la solución acuosa. En otros aspectos, se añade más de un tensioactivo aniónico a la solución acuosa. En otros aspectos, se añade más de un tensioactivo catiónico a la solución acuosa. En otros aspectos, cualquier combinación de tensioactivo seleccionado de tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos y tensioactivos catiónicos; por ejemplo, un tensioactivo no iónico y un tensioactivo aniónico, un tensioactivo no iónico y un tensioactivo catiónico, o un tensioactivo aniónico y un tensioactivo catiónico.

Los agentes no tensioactivos, no iónicos que encuentran uso para disociar los agregados de proteínas preexistentes y/o evitar la formación de nuevos agregados de proteínas en soluciones acuosas que contienen proteínas incluyen, por ejemplo, polietilenglicoles (PEG), preferentemente polietilenglicoles que tienen pesos moleculares de aproximadamente 400 a aproximadamente 6000 g/mol, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, arginina (que incluye L-arginina, arginina HCl, y similares), glucósidos de flavanona, naringina, rutina (rutinosido de quercetina) y dextranos, preferentemente dextranos que tienen pesos moleculares de aproximadamente 2.000 a 20.000 Da, y similares.

En algunos aspectos de la invención, se añade más de un agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa. En otros aspectos, se puede emplear cualquier combinación de tensioactivo(s) y agente(s) no tensioactivo(s), no iónico(s).

En algunos modos de realización, los procedimientos de reducción de la agregación de proteínas o reducción de la formación de agregados de proteínas comprenden además la etapa de filtrar la solución acuosa que comprende la proteína y el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico a través de una membrana de ultrafiltración. En algunos modos de realización, la membrana de ultrafiltración es una membrana de retención de parvovirus o una membrana que puede retirar parvovirus. En algunos modos de realización, la filtración es por filtración de flujo normal. En otros aspectos, la filtración es por filtración de flujo tangencial. En algunos modos de realización de la invención, los agregados restantes se retiran de la solución acuosa por ultrafiltración.

En algunos modos de realización, los procedimientos de reducción de la agregación de proteínas o reducción de la formación de agregados de proteínas comprenden además una etapa de prefiltrado y una etapa de ultrafiltración. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende las etapas de a) filtrar la solución acuosa a través del prefiltrado; b) añadir un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa para disociar agregados de proteínas o evitar la formación de agregados de proteínas; y c) filtrar la solución acuosa que comprende el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico a través de una o más membranas de ultrafiltración. En otros modos de realización de la invención, el procedimiento comprende las etapas de a) añadir un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico a la solución acuosa para disociar agregados de proteínas o evitar la formación de agregados de proteínas; b) filtrar la solución acuosa a través de un prefiltrado; y c) filtrar la solución acuosa que comprende el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico a través de una o más membranas de ultrafiltración. En algunos modos de realización, el prefiltrado es una o más capas de filtros de profundidad de adsorción o una o más capas de membranas microporosas cargadas o con superficie modificada.

Los procedimientos para medir la agregación de proteínas son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un sistema de recuento de partículas líquidas que usa análisis con oscurecimiento luminoso para determinar el número de partículas de un intervalo de tamaño específico. En algunos aspectos de la invención, se puede determinar la reducción de la agregación de proteínas comparando el número total de partículas en una solución acuosa de proteínas en presencia de un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico con el número total de partículas en una solución acuosa de proteínas en ausencia de un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico. En algunos aspectos de la invención, se puede determinar la reducción de la agregación de proteínas comparando el tamaño promedio de las partículas en una solución acuosa de proteínas en presencia de un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico con el tamaño promedio de las partículas en una solución acuosa de proteínas en ausencia de un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico.

Modos de realización ejemplares

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos de reducción del ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración en un procedimiento en el que se retiran partículas de virus de una solución acuosa que comprende dichas partículas de virus y al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento las etapas de a) añadir a dicha solución acuosa un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico, seleccionado del grupo que consiste en un polietilenglicol, un derivado de celulosa, arginina y un dextrano, y b) filtrar dicha solución acuosa que comprende dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a través de dichas membranas de ultrafiltración, en el que la presencia de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico en dicha solución acuosa reduce el ensuciamiento de dicha membrana de ultrafiltración.

En un aspecto del procedimiento anterior, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico. En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, Triton® X-100, Triton® X-405, lauromacrogol y polisorbato 80. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo es polisorbato 20 o Triton® X-100.

- 5 En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a dicha solución acuosa a una concentración de 1-10.000 ppm. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a dicha solución acuosa a una concentración de 10-200 ppm.
- 10 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración es una membrana de retención de parvovirus. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de menos de aproximadamente 100 nm o menos. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de aproximadamente 20 nm o menos.
- 15 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la etapa de filtrar dicha solución acuosa es por filtración de flujo normal.
- 20 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la proteína es un anticuerpo. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o humanizado.
- 25 En un modo de realización del procedimiento anterior, la adición de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 10 %. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la adición de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 50 %.
- 30 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, las partículas de virus son partículas de parvovirus.
- 35 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el procedimiento comprende además la etapa de filtrar dicha solución acuosa a través de una o más capas de filtros de profundidad de adsorción o una o más capas de membranas microporosas cargadas o con superficie modificada, antes de la filtración de dicha solución acuosa a través de dicha membrana de ultrafiltración.
- 40 En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos de potenciación de la eficacia del rendimiento de filtración de una membrana de ultrafiltración en un procedimiento en el que se retiran partículas de virus de una solución acuosa que comprende dichas partículas de virus y al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento añadir un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico seleccionado del grupo que consiste en un polietilenglicol, un derivado de celulosa, arginina y un dextrano a dicha solución acuosa antes de filtrar dicha solución acuosa a través de dichas membranas de ultrafiltración, en el que la presencia de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico en dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en comparación con la ausencia de dicho tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico.
- 45 En un aspecto del procedimiento anterior en el que dicho tensioactivo es un tensioactivo no iónico. En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, Triton® X-100, Triton® X-405, lauromacrogol y polisorbato 80. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo es polisorbato 20 o Triton® X-100.
- 50 En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a dicha solución acuosa a una concentración de 1-10.000 ppm. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a dicha solución acuosa a una concentración de 10-200 ppm.
- 55 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración es una membrana de retención de parvovirus. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de menos de aproximadamente 100 nm o menos. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de aproximadamente 20 nm o menos.
- 60 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la etapa de filtrar dicha solución acuosa es por filtración de flujo normal.
- 65 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la proteína es un anticuerpo. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o humanizado.
- En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la adición de dicho tensioactivo o dicho

agente no tensioactivo, no iónico a dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 10 %. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la adición de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 50 %.

5 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, las partículas de virus son partículas de parvovirus.

10 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el procedimiento comprende además la etapa de filtrar dicha solución acuosa a través de una o más capas de filtros de profundidad de adsorción o una o más capas de membranas microporosas cargadas o con superficie modificada, antes de la filtración de dicha solución acuosa a través de dicha membrana de ultrafiltración.

15 En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para disociar agregados de polipéptidos o reducir la formación de agregados de polipéptidos en una corriente de alimentación de ultrafiltración que comprende una solución acuosa que comprende al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento añadir un tensioactivo o un agente no tensioactivo, no iónico seleccionado del grupo que consiste en un polietilenglicol, un derivado de celulosa, arginina y un dextrano a dicha solución acuosa.

20 En un aspecto del procedimiento anterior, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico. En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, Triton® X-100, Triton® X-405, laurmacrogol y polisorbato 80. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo es polisorbato 20 o Triton® X-100.

25 En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a dicha solución acuosa a una concentración de 1-10.000 ppm. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a dicha solución acuosa a una concentración de 10-200 ppm.

30 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el procedimiento comprende además la etapa de filtrar dicha solución acuosa que comprende dicho tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico a través de una membrana de ultrafiltración. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración es una membrana de retención de parvovirus. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de menos de aproximadamente 100 nm o menos. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de aproximadamente 20 nm o menos. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la etapa de filtrar dicha solución acuosa es por filtración de flujo normal.

40 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la proteína es un anticuerpo. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o humanizado.

45 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la adición de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 10 %. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la adición de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 50 %.

50 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el procedimiento comprende además la etapa de filtrar dicha solución acuosa a través de una o más capas de filtros de profundidad de adsorción o una o más capas de membranas microporosas cargadas o con superficie modificada, antes de la filtración de dicha solución acuosa a través de dicha membrana de ultrafiltración.

55 En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos de reducción del ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración en un procedimiento en el que se retiran partículas de virus de una solución acuosa que comprende dichas partículas de virus y al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento las etapas de a) filtrar dicha solución acuosa a través de un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en una o más capas de filtros de profundidad de adsorción y una o más capas de membranas microporosas cargadas o con superficie modificada; b) añadir un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico seleccionado del grupo que consiste en un polietilenglicol, un derivado de celulosa, arginina y un dextrano a dicha solución acuosa; y c) filtrar dicha solución acuosa que comprende dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a través de dichas membranas de ultrafiltración, en el que la presencia de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico en dicha solución acuosa reduce el ensuciamiento de dicha membrana de ultrafiltración.

65 En un aspecto del procedimiento anterior, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico. En un aspecto de cualquiera

de los procedimientos anteriores, el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, Triton® X-100, Triton® X-405, laurmacrogol y polisorbato 80. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo es polisorbato 20 Triton® X-100.

5 En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a dicha solución acuosa a una concentración de 1-10.000 ppm. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a dicha solución acuosa a una concentración de 10-200 ppm.

10 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración es una membrana de retención de parvovirus. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de menos de aproximadamente 100 nm o menos. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de aproximadamente 20 nm o menos.

15 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la etapa de filtrar dicha solución acuosa es por filtración de flujo normal.

20 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la proteína es un anticuerpo. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o humanizado.

25 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la adición de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 10 %. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la adición de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 50 %.

30 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, las partículas de virus son partículas de parvovirus.

35 En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos de reducción del ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración en un procedimiento en el que se retiran partículas de virus de una solución acuosa que comprende dichas partículas de virus y al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento las etapas de a) añadir un tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico seleccionado del grupo que consiste en un polietilenglicol, un derivado de celulosa, arginina y un dextrano a dicha solución acuosa, b) filtrar dicha solución acuosa a través de un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en una o más capas de filtros de profundidad de adsorción y una o más capas de membranas microporosas cargadas o con superficie modificada; y c) filtrar dicha solución acuosa que comprende dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a través de dichas membranas de ultrafiltración, en el que la presencia de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico en dicha solución acuosa reduce el ensuciamiento de dicha membrana de ultrafiltración.

45 En un aspecto del procedimiento anterior, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico. En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, Triton® X-100, Triton® X-405, laurmacrogol y polisorbato 80. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo es polisorbato 20 Triton® X-100.

50 En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a dicha solución acuosa a una concentración de 1-10.000 ppm. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico se añade a dicha solución acuosa a una concentración de 10-200 ppm.

55 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración es una membrana de retención de parvovirus. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de menos de aproximadamente 100 nm o menos. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de aproximadamente 20 nm o menos.

60 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la etapa de filtrar dicha solución acuosa es por filtración de flujo normal.

65 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la proteína es un anticuerpo. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o humanizado.

En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la adición de dicho tensioactivo o dicho

agente no tensioactivo, no iónico a dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 10 %. En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, la adición de dicho tensioactivo o dicho agente no tensioactivo, no iónico a dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 50 %.

5 En un modo de realización de cualquiera de los procedimientos anteriores, las partículas de virus son partículas de parvovirus.

10 Todos los rasgos característicos divulgados en esta memoria descriptiva se pueden combinar en cualquier combinación. Cada rasgo característico divulgado en esta memoria descriptiva se puede reemplazar por un rasgo característico alternativo que tenga el propósito igual, equivalente o similar. Por tanto, a menos que se establezca expresamente de otro modo, cada rasgo característico divulgado es solo un ejemplo de una serie genérica de rasgos característicos equivalentes o similares.

15 EJEMPLOS

Los ejemplos, que se pretende que sean puramente ejemplares de la invención y, por lo tanto, no se deben considerar que limitan la invención de ningún modo, también describen y detallan aspectos y modos de realización de la invención analizada anteriormente. A menos que se indique de otro modo, la temperatura está en grados centígrados y la presión es o está cerca de la atmosférica. Los anteriores ejemplos y la descripción detallada se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación. Aunque se ha descrito la invención anterior con algo de detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica a la vista de las enseñanzas de la presente invención que se pueden realizar determinados cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25 **Ejemplo 1: El efecto de polisorbato 20 sobre el comportamiento de la membrana de ultrafiltración**

En un esfuerzo por determinar el efecto que determinados aditivos de tensioactivo o agente no tensioactivo, no iónico podrían tener sobre la eficacia de la ultrafiltración de diversas soluciones acuosas que contienen anticuerpos, se prepararon las soluciones de alimentación acuosas mostradas en la tabla 1 a continuación y se emplearon en los siguientes experimentos descritos.

Tabla 1

Anticuerpo	pH	Tampón	Concentración de anticuerpo
Anticuerpo anti-PDL1	6,0	Acetato de sodio 0,110 M, MES 0,024 M	5,56 mg/ml
Anticuerpo anti-DR5	6,0	Tris 65 mM, ácido fosfórico 38 mM	11,82 mg/ml
Anticuerpo anti-VEGF	5,5	Ácido acético 0,086 M, base Tris 0,10 M, ácido cítrico 0,019 M	5,05 mg/ml
Anticuerpo anti-HER2	5,6	HEPES 0,25 M acetato de sodio 0,030 M	15,96 mg/ml
Anticuerpo anti-MUC16	5,5	Acetato de sodio 0,2 M	7,02 mg/ml

35 Para medir el efecto que tiene un tensioactivo añadido sobre la tasa de ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración, se filtraron las soluciones de alimentación acuosas que contienen proteínas descritas en la tabla 1 (con o bien sin la adición de un agente tensioactivo) a través de una membrana de ultrafiltración Viresolve® Pro (Millipore Corporation). Se realizó la filtración de las diversas soluciones que contienen proteínas a través de la membrana de ultrafiltración a una presión transmembranaria inicial de aproximadamente 10 psi (69 kPa) y se dejó que la presión transmembranaria (debido al ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración) creciera hasta que se alcanzó una presión transmembranaria de aproximadamente 50 psi (345 kPa), momento en el que se detuvo el procedimiento de ultrafiltración. Si no se produjo sustancialmente ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración, se detuvo el procedimiento de ultrafiltración antes de alcanzar una presión transmembranaria de aproximadamente 50 psi (345 kPa). A continuación, se determinó el rendimiento del anticuerpo (medido por g/m² de área de superficie de membrana) y se representó gráficamente frente a la presión transmembranaria. La presión del punto final de la filtración fue de 40 psi (276 kPa) a menos que se indique.

50 Los datos obtenidos de experimentos que miden el efecto de diversas concentraciones de polisorbato 20 sobre el ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración con diversas soluciones acuosas diferentes que comprenden diferentes moléculas de anticuerpo se muestran en las figuras 1 a 4. Como se muestra en las figuras 1 a 4, añadir tan solo 20 ppm de polisorbato 20 a una solución acuosa que contiene anticuerpos tiene un efecto beneficioso y reproducible sobre la prevención del ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración durante el procedimiento de ultrafiltración. El efecto antiensuciamiento beneficioso de polisorbato 20 se demuestra con soluciones acuosas que

comprenden anticuerpos muy diferentes y en un amplio intervalo de concentraciones de polisorbato 20 sometidas a prueba. Estos datos demuestran claramente que los tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 20 son útiles como aditivos que se pueden emplear en corrientes de alimentación que contienen proteínas para reducir o evitar el ensuciamiento de las membranas de ultrafiltración durante el procedimiento de ultrafiltración.

Ejemplo 2: El efecto de Triton® X-100 sobre el comportamiento de la membrana de ultrafiltración

En un segundo conjunto de experimentos, se determinó el efecto de la adición de Triton® X-100 sobre la tasa de ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración como se describe en el ejemplo 1 anterior. Los datos obtenidos de experimentos que miden el efecto de diversas concentraciones de Triton® X-100 sobre el ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración con diversas soluciones acuosas diferentes que comprenden diferentes moléculas de anticuerpo se muestran en las figuras 4 a 7. Como se muestra en las figuras 4 a 7, añadir tan solo 20 ppm de Triton® X-100 a una solución acuosa que contiene anticuerpos tiene un efecto beneficioso y reproducible sobre la prevención del ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración durante el procedimiento de ultrafiltración. El efecto antiensuciamiento beneficioso de Triton® X-100 se demuestra con soluciones acuosas que comprenden anticuerpos muy diferentes y en un amplio intervalo de concentraciones de polisorbato 20 sometidas a prueba. Estos datos demuestran claramente que los tensioactivos no iónicos tales como Triton® X-100 son útiles como aditivos que se pueden emplear en corrientes de alimentación que contienen proteínas para reducir o evitar el ensuciamiento de las membranas de ultrafiltración durante el procedimiento de ultrafiltración.

Ejemplo 3: El efecto de la prefiltración en combinación con la adición de tensioactivo sobre el comportamiento de la membrana de ultrafiltración

En otro conjunto de experimentos, se investigó el efecto de la prefiltración en combinación con la adición de tensioactivo sobre la tasa de ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración. Específicamente, se trataron opcionalmente las soluciones acuosas que contienen anticuerpos anti-PDL1 y anti-VEGF descritas en la tabla 1 anterior con un tensioactivo y a continuación se sometieron a prefiltración a través de una membrana de intercambio catiónico Mustang S® (Pall Corporation). Posteriormente a la prefiltración a través de la membrana de intercambio catiónico Mustang S®, la solución de filtrado/tensioactivo se sometió a ultrafiltración como se describe anteriormente. Los datos obtenidos de estos experimentos se muestran en las figuras 8 y 9.

Como se muestra en las figuras 8 y 9, la filtración simple a través de la Mustang S® tiene poco o ningún efecto beneficioso sobre la prevención o reducción del ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración posterior. Por el contrario, sin embargo, cuando se combinó la prefiltración de la solución acuosa que contiene anticuerpos con la adición de un tensioactivo no iónico, se observó una fuerte reducción en el ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración posterior. Estos datos demuestran claramente que el uso de una etapa de prefiltración anterior en combinación con la adición de tensioactivo proporciona un efecto fuerte, reproducible y beneficioso para reducir o evitar el ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración posterior en un procedimiento de ultrafiltración para soluciones acuosas que contienen proteínas.

Ejemplo 4: El efecto de otros tensioactivos y determinados agentes no tensioactivos, no iónicos sobre el comportamiento de la membrana de ultrafiltración

Todavía en otro conjunto de experimentos, se investigó el efecto de diversos aditivos de tensioactivo o de no tensioactivo, no iónico diferentes sobre la tasa de ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración posterior. Más específicamente, se añadieron diversos tensioactivos y agentes no tensioactivos, no iónicos diferentes a diferentes soluciones acuosas que contienen anticuerpos (como se describe en la tabla 1), a continuación, se sometieron a ultrafiltración a través de una membrana de ultrafiltración Viresolve® Pro como se describe en el ejemplo 1 anterior. Los datos de estos experimentos se muestran en las figuras 10 y 11.

Como se muestra en las figuras 10 y 11, se observó una reducción significativa en el ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración posterior con una variedad de diferentes tensioactivos y agentes no tensioactivos, no iónicos. En la tabla 2 se proporcionan datos adicionales generados con diversas combinaciones de solución de anticuerpo, aditivo y prefiltro.

Tabla 2

Anticuerpo	Excipiente o prefiltro	Rendimiento en g/m ² (presión transmembrana final lograda)
Anti-PDL1	Ninguno	200
	Prefiltro Mustang® S	320
	Triton® X-100	> 6000 (28,0)
	Polisorbato 20	> 6000 (29,5)

	PEG6000	250
	Octil-β-D-glucopiranosido	200
	L-arginina HCl	400
	Triton® X-100 + prefiltro Mustang® S	> 6000 (29,4)
Anti-DR5	Ninguno	400
	Triton® X-100	> 5000 (27,8)
	Polisorbato 20	> 1750 (32,8)
Anti-VEGF	Ninguno	450
	Prefiltro Mustang® S	4000
	Triton® X-100	4000
	Polisorbato 20	1500
	PEG6000	1200
	Octil-β-D-glucopiranosido	800
	L-arginina HCl	300
	Triton® X-100 + prefiltro Mustang® S	> 7200 (18,3)
	Polisorbato 20 + prefiltro Mustang® S	> 7200 (24,3)
Anti-HER2	Ninguno	500
	Prefiltro Mustang® S	>12500 (30,1) >10000 (27,6)
	Triton® X-100	5000
	PS20	600
	Triton® X-100 + prefiltro Mustang® S	>23000 (18,6) >10000 (17,1)
	PS 20 + prefiltro Mustang® S	>23000 (22,0) >10000 (21,0)

Estos datos demuestran que una amplia variedad de tensioactivos y determinados agentes no tensioactivos, no iónicos son útiles como aditivos para soluciones acuosas que contienen proteínas para la reducción y/o prevención del ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración durante el procedimiento de ultrafiltración. Estos tensioactivos y agentes no tensioactivos, no iónicos son útiles con o bien sin la incorporación de una etapa de prefiltración antes de la etapa de ultrafiltración posterior.

Ejemplo 5. El polisorbato 20 no tiene un impacto negativo sobre la eliminación vírica

Se realizó un estudio para demostrar que la adición de un tensioactivo directamente a una corriente de alimentación de proteínas no afectó negativamente sobre la eliminación vírica por un filtro de parvovirus de membrana de ultrafiltración. Se realizó el estudio como sigue.

Reservas de virus

El virus diminuto del ratón (MMV) es un parvovirus de genoma de ADN monocatenario sin envoltura, de aproximadamente 18-24 nm de tamaño, que es altamente resistente a la inactivación química. Se adquirió la reserva de MMV de BioReliance (Rockville, MD).

Filtración del virus

Se añadieron las materias primas con y sin aditivos de tensioactivo 1/100 en volumen con la reserva de MMV. Se filtró la materia prima añadida a través de un filtro de 0,22 μm y Viresolve Pro. Se determinó el valor del virus por Q-PCR después del conjunto de filtro de 0,22 μm y Viresolve Pro.

Cuantificación del virus

El ensayo de Q-PCR se describió previamente por Strauss *et al.*, (2008) *Biotechnology and Bioengineering*, 102:168-175 y Zhan *et al.*, (2002) *Biologicals*, 30:259-70. Se realizaron modificaciones en la etapa de digestión de nucleasas para optimizar la retirada del ADN libre residual. Se ajustan las muestras a pH 8-9 y se someten a digestión con enzimas nucleasas microcócica durante 30 minutos a 37 °C. A continuación se realizó la extracción de ADN genómico vírico usando EZ1 Advanced XL con el minikit de virus EZ1 v2.0 (Qiagen Inc., Valencia, CA). A continuación se realizó la reacción de Q-PCR como se describe previamente.

Eliminación del virus

La eliminación del virus se expresa como el valor de reducción logarítmica (VRL). Se calcularon los VRL como:

$$VRL = \log_{10} \times (\text{virus total en carga/virus total en el conjunto de filtrado})$$

Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Anticuerpo	Tensioactivo	VRL
Anti-VEGF	0 ppm polisorbato 20	4,05
Anti-VEGF	100 ppm polisorbato 20	4,55
Anti-VEGF	1000 ppm polisorbato 20	4,37
Anti-PDL1	0 ppm polisorbato 20	4,30
Anti-PDL1	100 ppm polisorbato 20	4,59
Anti-PDL1	1000 ppm polisorbato 20	4,67

Los resultados de estos análisis demuestran que la adición del tensioactivo polisorbato 20 a la corriente de alimentación que contiene proteínas no afecta adversamente a la capacidad de una membrana de ultrafiltración para retirar el virus de la corriente de alimentación.

Ejemplo 6: Efecto del pretratamiento de la membrana de ultrafiltración con tensioactivo

Se realizó un estudio para comparar los efectos de la adición de un tensioactivo directamente en una corriente de alimentación antes de la ultrafiltración con el efecto del pretratamiento de la membrana con un tensioactivo antes de la ultrafiltración. Se preparó la corriente de alimentación de proteínas de una solución acuosa de anticuerpo anti-VEGF como se muestra en la tabla 1. La membrana de ultrafiltración fue una membrana Viresolve® Pro. En algunos casos, se preparó la membrana Viresolve® Pro pretratando la membrana con polisorbato 20, filtrando 1000 ppm de polisorbato 20 (disuelto en agua) antes de la etapa de ultrafiltración. En otros casos, se añadió polisorbato 20 directamente a la corriente de alimentación antes de la ultrafiltración usando una membrana que no se había pretratado con un tensioactivo. Como control, se añadió una tercera corriente de alimentación sin tensioactivos, directamente a la corriente de alimentación o bien como pretratamiento de la membrana. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 12. Los datos en la figura 12 demuestran que se observó el mayor rendimiento para el caso en el que se añadió polisorbato 20 directamente a la corriente de alimentación del anticuerpo anti-VEGF. Por el contrario, el pretratamiento de la membrana de ultrafiltración con polisorbato 20 dio como resultado rendimientos que estaban por debajo de los rendimientos obtenidos para la muestra de control. Estos datos demuestran que la adición de un tensioactivo u otro agente no tensioactivo, no iónico directamente a la corriente de alimentación acuosa que contiene proteínas, en comparación con el pretratamiento de la membrana de ultrafiltración con el mismo, tiene un efecto beneficioso significativo sobre la reducción o prevención del ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración.

Ejemplo 7: Uso de tensioactivos para disociar agregados de proteínas en soluciones acuosas

Se realizó un estudio para evaluar la disociación de agregados de proteínas usando un tensioactivo. Se prepararon muestras añadiendo solución madre al 10 % de polisorbato 20 o bien Triton® X-100 en la solución acuosa anti-PDL1 descrita en la tabla 1 para alcanzar la concentración de excipiente final de 1000 ppm. Se incubaron las soluciones acuosas que contenían excipiente a temperatura ambiente durante 30 minutos antes del análisis. Se midieron partículas de agregados de ≥1,6 µm en la solución acuosa usando un HIAC (sistema de recuento de partículas líquidas, modelo 9703). Se calibró el instrumento usando patrones de dispersión de partículas PSL de tamaños conocidos que varían de 1,5 µm a 100 µm. Se mezclaron suavemente las muestras agitando el recipiente para dispersar homogéneamente las partículas inmediatamente antes del análisis. Se sometieron a prueba individualmente cuatro ciclos (1 ml para cada ciclo) de las muestras acuosas, y se contaron los números de partículas en los tamaños designados. Se registraron los datos de los recuentos de partículas para los últimos tres ciclos, mientras que se desechó el resultado del primer ciclo. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 4 a continuación, donde los valores numéricos representan el número de partículas del tamaño referenciado por ml de solución acuosa.

Tabla 4

Tamaño de partícula (µm)	Sin tensioactivo	Polisorbato 20	Triton® X-100
1,6	103267 ± 5612	21433 ± 2479	14333 ± 1617
2,0	57967 ± 4823	13567 ± 1193	9500 ± 1054
5,0	11567 ± 1387	2967 ± 208	2633 ± 666
10,0	3800 ± 436	600 ± 300	800 ± 100
25,0	333 ± 115	67 ± 115	67 ± 58

- 5 Como se muestra en la tabla 4, los datos de HIAC muestran que la adición de tensioactivo en una solución de alimentación acuosa que contiene anticuerpos puede disociar partículas de agregados preexistentes y, por lo tanto, puede funcionar para mejorar el comportamiento de la membrana de ultrafiltración reduciendo o evitando el ensuciamiento de la misma.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de reducción del ensuciamiento de una membrana de ultrafiltración en un procedimiento en el que se retiran partículas de virus de una solución acuosa que comprende dichas partículas de virus y al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento las etapas de
 - a) añadir a dicha solución acuosa 10-200 ppm de polisorbato 20 o Triton® X-100, y
 - b) filtrar dicha solución acuosa que comprende dichos de 10 a 200 ppm de polisorbato 20 o Triton® X-100 a través de dichas membranas de ultrafiltración,
 en el que la presencia de dichos de 10 a 200 ppm de polisorbato 20 o Triton® X-100 en dicha solución acuosa reduce el ensuciamiento de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 50 % en comparación con no añadir dichos de 10 a 200 ppm de polisorbato 20 o Triton® X-100 en dicha solución acuosa, y en el que dicha etapa de filtrar dicha solución acuosa es por filtración de flujo normal.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha membrana de ultrafiltración es una membrana de retención de parvovirus.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de menos de aproximadamente 100 nm o menos.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro de aproximadamente 20 nm o menos.
5. El procedimiento de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha proteína es un anticuerpo.
6. El procedimiento de las reivindicaciones 1-5, en el que la adición de dichos 10-200 ppm de polisorbato 20 o Triton® X-100 potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 10 %.
7. El procedimiento de las reivindicaciones 1-6, en el que la adición de dichos 10-200 ppm de polisorbato 20 o Triton® X-100 a dicha solución acuosa potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en al menos un 50 %.
8. El procedimiento de las reivindicaciones 1-7, que comprende además la etapa de filtrar dicha solución acuosa a través de una o más capas de filtros de profundidad de adsorción o una o más capas de membranas microporosas cargadas o con superficie modificada, antes de o después de la etapa a) de la reivindicación 1.
9. Un procedimiento de potenciación de la eficacia del rendimiento de filtración de una membrana de ultrafiltración en un procedimiento en el que se retiran partículas de virus de una solución acuosa que comprende dichas partículas de virus y al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento añadir 10-200 ppm de polisorbato 20 o Triton® X-100 a dicha solución acuosa antes de filtrar dicha solución acuosa a través de dichas membranas de ultrafiltración, en el que la presencia de dichos 10-200 ppm de polisorbato 20 o Triton® X-100 potencia la eficacia del rendimiento de filtración de dicha membrana de ultrafiltración en comparación con la ausencia de dichos 10-200 ppm de polisorbato 20 o Triton® X-100, y en el que dicha etapa de filtrar dicha solución acuosa es por filtración de flujo normal.
10. Un procedimiento para disociar los agregados de polipéptidos o reducir la formación de agregados de polipéptidos en una corriente de alimentación de ultrafiltración que comprende una solución acuosa que comprende al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento añadir 10-200 ppm de polisorbato 20 o Triton® X-100 a dicha solución acuosa.
11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-10, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-PDL1, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-VEGF, un anticuerpo anti-MUC16 o un anticuerpo anti-DR5.

Figura 1

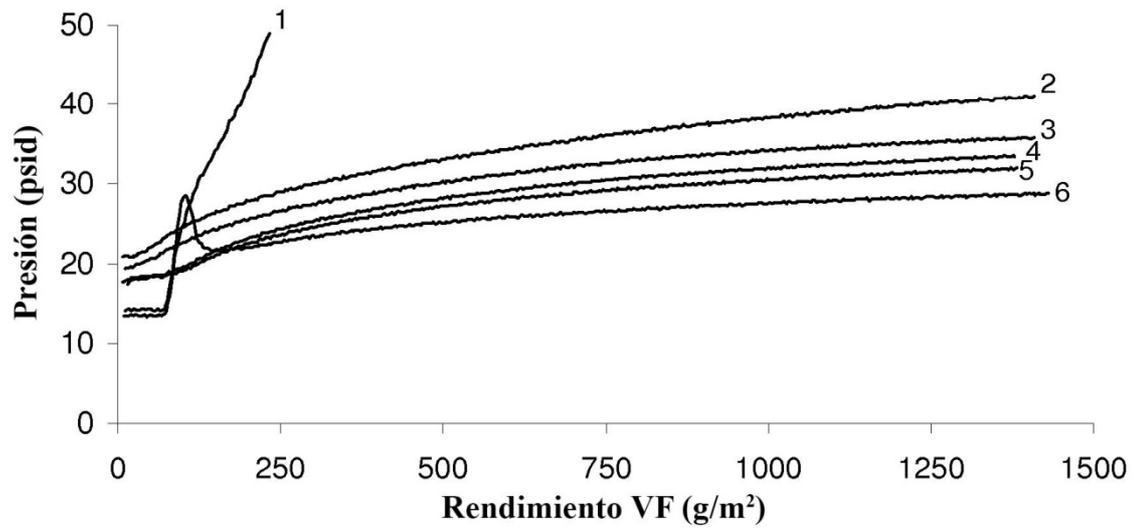


Figura 2

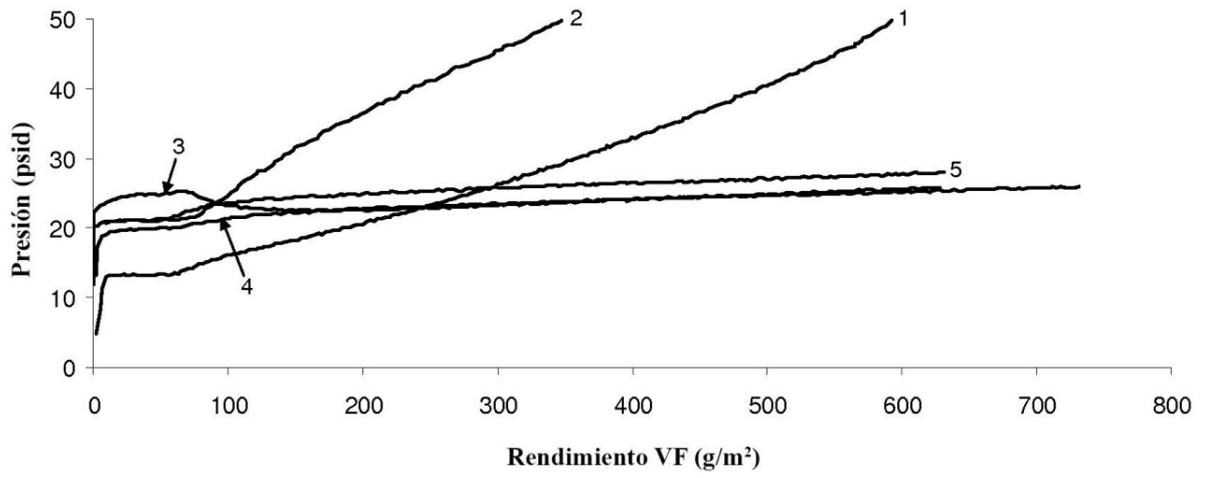


Figura 3

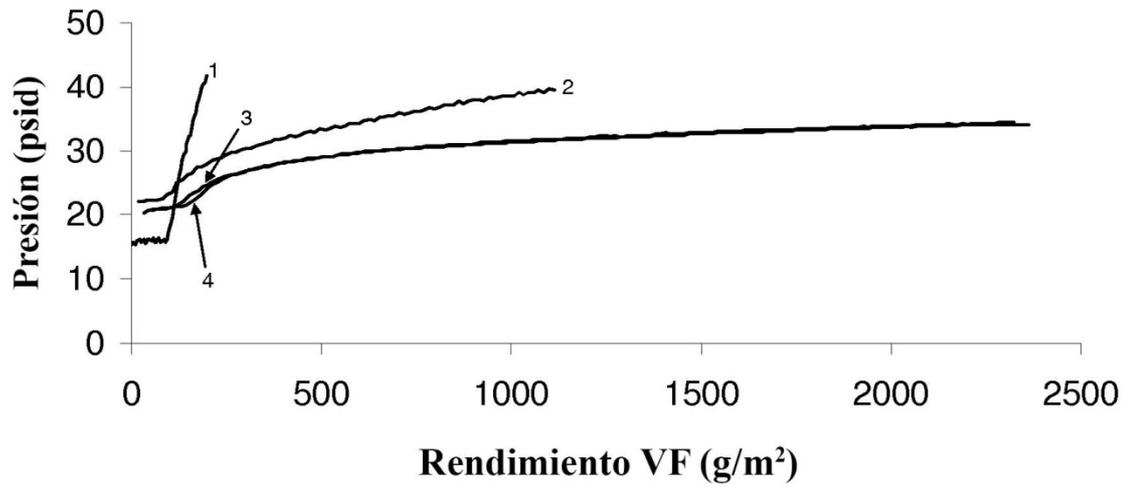


Figura 4

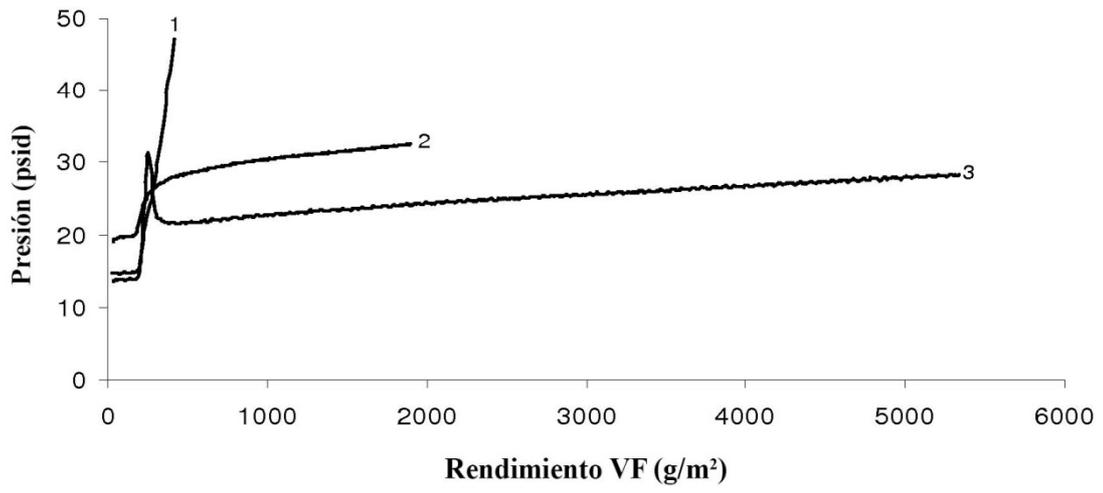


Figura 5

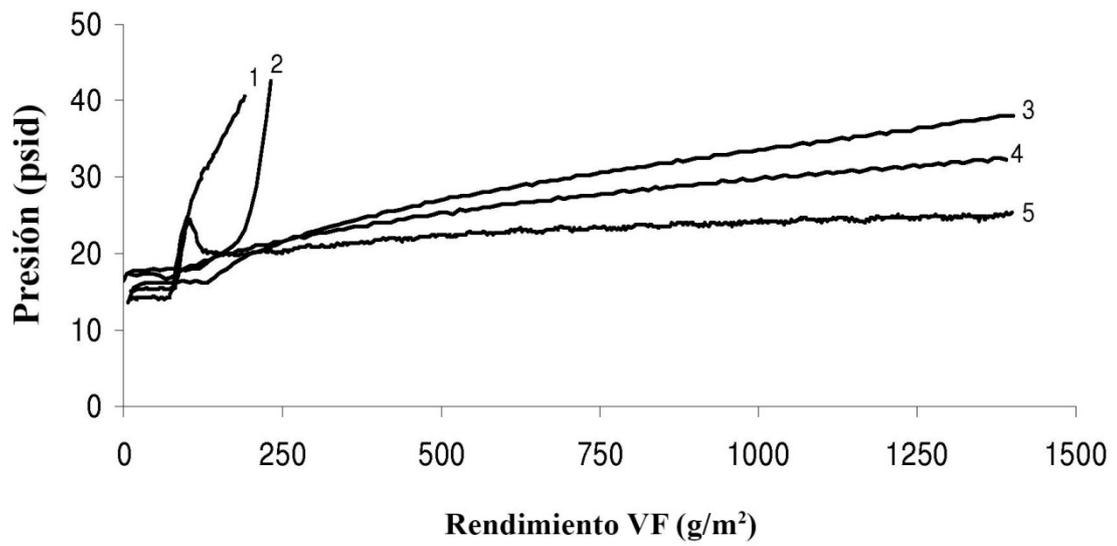


Figura 6

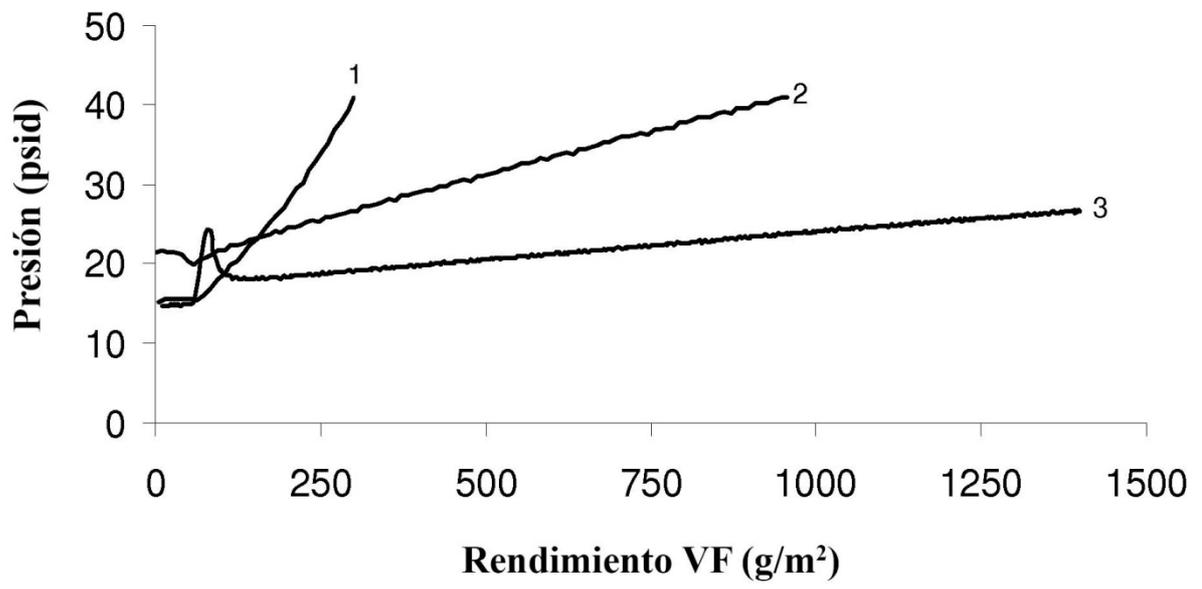


Figura 7

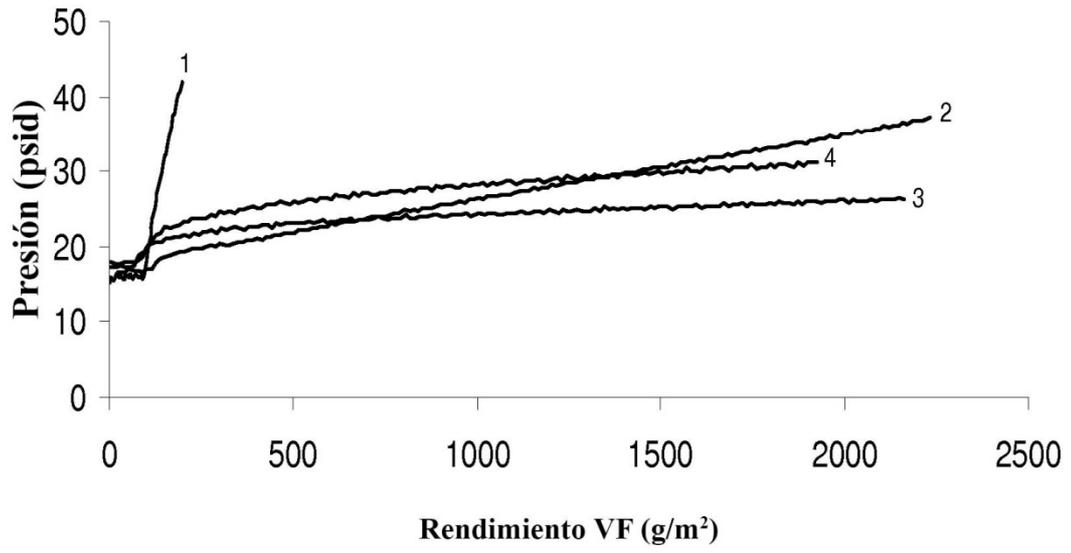


Figura 8

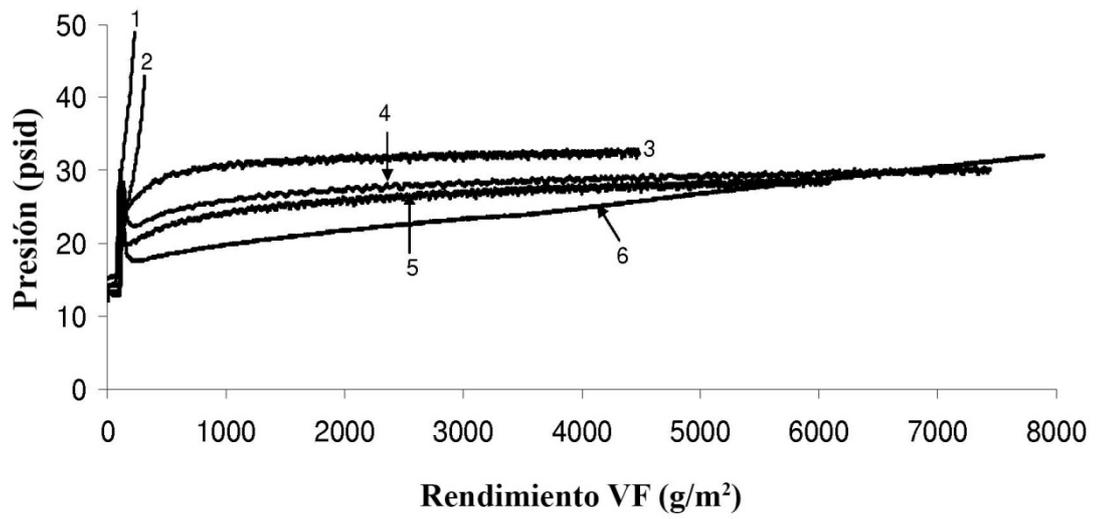


Figura 9

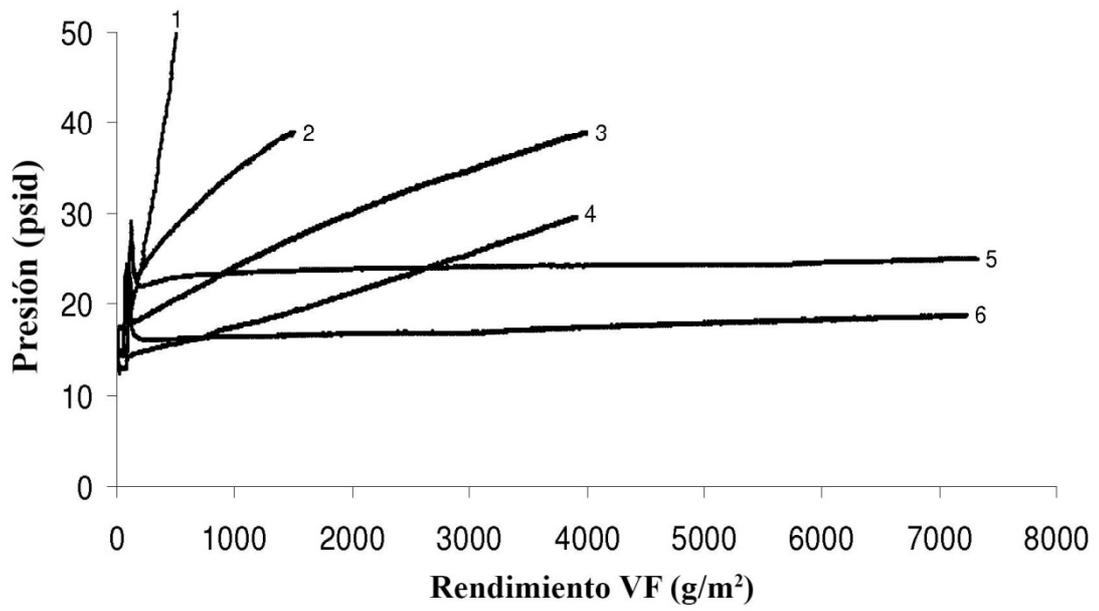


Figura 10

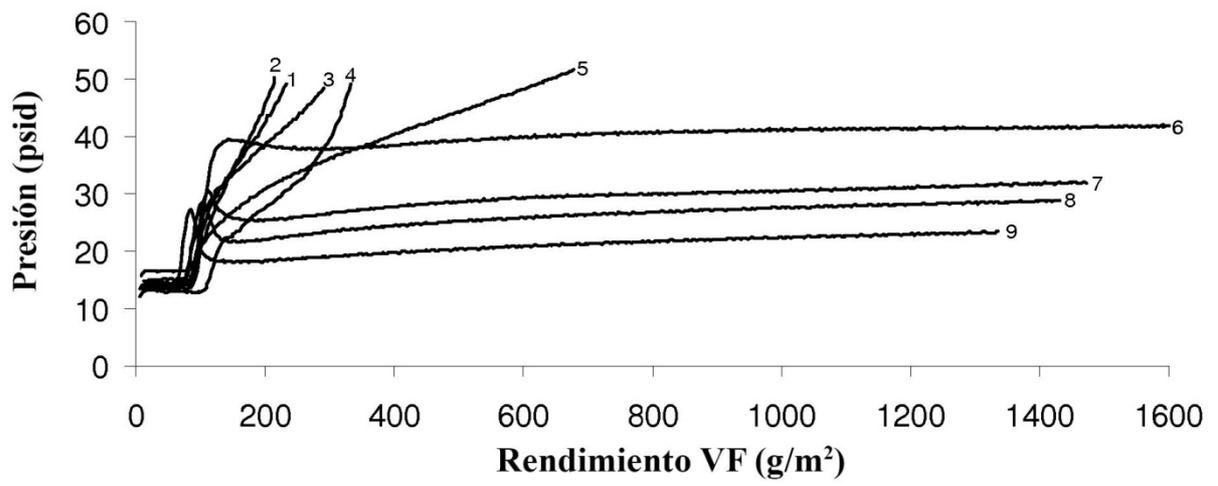


Figura 11

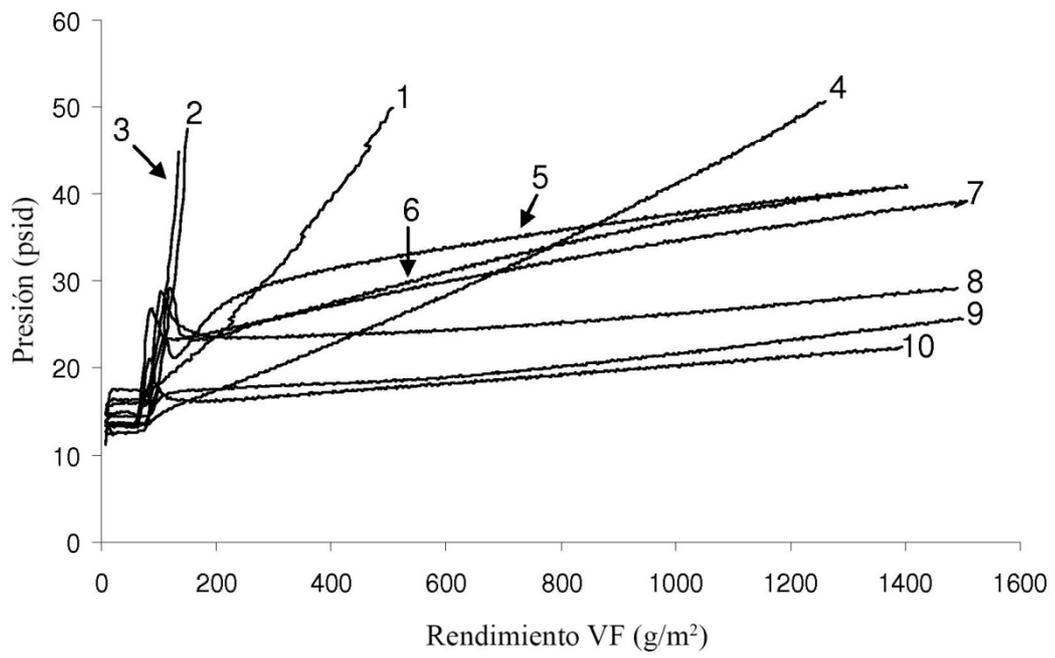


Figura 12

