

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 346**

51 Int. Cl.:

B01D 61/24 (2006.01)

B01D 61/36 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2010 PCT/US2010/028486**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10111378**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2010 E 10723831 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2411125**

54 Título: **Evaporación por membrana para generar medicamentos proteicos altamente concentrados**

30 Prioridad:

24.03.2009 US 162743 P

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

28.11.2019

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**BOLTON, GLEN, REED;
ACHARYA, HARI y
BOESCH, AUSTIN, WAYNE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 733 346 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

Evaporación por membrana para generar medicamentos proteicos altamente concentrados**Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a procedimientos para la generación de proteínas altamente concentradas, de acuerdo con la reivindicación 1, por ej., anticuerpos o medicamentos proteicos altamente concentrados. De manera específica, la invención se refiere a procedimientos para la generación de proteínas altamente concentradas que comprenden la circulación de una primera solución de proteínas a través de un dispositivo de ultrafiltración mientras se aplica un flujo de gas al lado permeado de una membrana porosa dentro del dispositivo de ultrafiltración, y la recogida de una segunda solución de proteínas, en el que la segunda solución de proteínas está altamente concentrada, por ej., mayor que aproximadamente 260 gramos de proteína por litro de solución. También se desvela un aparato para su uso en el procedimiento de generación de proteínas altamente concentradas.

Técnica antecedente relacionada

15 El paso de concentración de una proteína en una solución a menudo es el último paso en la producción y purificación de proteínas, y comúnmente es un paso necesario tanto para aplicaciones farmacéuticas como de biotecnología. Sin embargo, los procedimientos usados en la actualidad para la concentración de proteínas tienen varias desventajas significativas.

20 Por ejemplo, algunos procedimientos para la concentración de soluciones implican procesos de destilación, por ej., destilación osmótica (también conocido como evaporación osmótica) o destilación térmica. En la destilación térmica, dos cámaras del aparato, una que contiene la solución de alimentación (tal como una solución que contiene soluto, por ej., una solución que contiene proteína) y otra que contiene el destilado (tal como un disolvente libre de soluto, por ej., un disolvente libre de proteínas) están separados por una membrana porosa hidrófoba. Véase, por ej., Godino *et al.* (1996) *J. Membr. Sci.* 121:83 a 93; Khaeyet *et al.* (2000) *J. Membr. Sci.* 165:261 a 272. Una diferencia de temperatura se mantiene entre las dos cámaras, de forma que la temperatura de la cámara que contiene la alimentación sea mayor que la temperatura de la cámara de material destilado. La diferencia de temperatura entre las cámaras provoca una diferencia de presión de vapor, que impulsa la transferencia de masa de la cámara que contiene la alimentación a la cámara de material destilado. La fase gaseosa está presente sólo dentro de los poros de la membrana hidrófoba. La principal desventaja de la destilación térmica es que es inadecuada para la concentración de la mayoría de las soluciones de proteínas porque las altas temperaturas pueden dañar solutos proteicos.

30 La destilación osmótica implica un principio similar a destilación térmica, excepto que no se mantiene un gradiente de temperatura entre las dos cámaras. Véase, por ej., Kunz *et al.* (1996) *J. Membr. Sci.* 121:25 a 36. Una membrana porosa hidrófoba separa las dos cámaras, y las dos cámaras tienen diferentes concentraciones de solutos, que es la fuerza impulsora para la transferencia de masa. La cámara de material destilado a menudo contiene altas concentraciones de solutos, por ej., sales, con el fin de mantener las diferencias de presión osmótica. Sin embargo, en este procedimiento, las concentraciones de proteínas alcanzables se limitan a la presión osmótica de la solución de sal. De manera adicional, la membrana porosa hidrófoba crea una interfase aire-líquido, que puede dañar algunas proteínas.

40 En un procedimiento diferente de la concentración de proteínas que no emplea las diferencias de presión osmótica o de vapor, una solución de proteínas se bombea en un dispositivo de ultrafiltración a alta presión, lo que permite que el disolvente fluya a través de la membrana del dispositivo mientras que las proteínas se retienen (véase, por ej., la FIG. 2). La solución que contiene la proteína se puede hacer recircular a un tanque de retención a medida que el disolvente sale del material permeado. El flujo de disolvente es provocado por la diferencia en la presión aplicada entre los lados de material retenido y permeado del dispositivo, de manera típica de aproximadamente 68947,6 a 45 aproximadamente 689476 Pa. Cuando la concentración de proteínas corriente arriba de la membrana se hace lo suficientemente alta, la presión osmótica de proteína llega a ser igual al gradiente de presión aplicada y el flujo de disolvente se detiene (punto de gel). La desventaja de este procedimiento de uso común es que este llamado " punto de gel " limita las concentraciones alcanzables con este procedimiento a un máximo de aproximadamente 200 gramos por litro para la mayoría de las proteínas.

50 Por lo tanto, debido a las limitaciones de los procedimientos de concentración de proteínas existentes, hay una necesidad de nuevos procedimientos de producción de soluciones de proteínas altamente concentradas, por ej., una solución de anticuerpo altamente concentrada, una solución de proteínas terapéutica altamente concentrada, etc. Las concentraciones de proteínas se incrementan por encima del intervalo actual, por ej., de aproximadamente 50 a 200 g/L de una solución de anticuerpo, lo cual de este modo reduce los volúmenes de almacenamiento. A su vez, 55 también se reducen los requisitos de volumen congelador. El tiempo y el espacio requerido para el secado por congelación (liofilización) se reducen porque hay hasta, o mayor que, aproximadamente una reducción del 30% en el volumen de agua que debe ser eliminado. Una solución de proteínas altamente concentrada incrementará la presión osmótica de la solución, lo que impide el crecimiento bacteriano, e incrementará la viscosidad de la solución de

proteínas,

El documento WO 95/35153 desvela un procedimiento de destilación por membrana aplicable a, por ej., las soluciones de proteínas que contienen compuestos termosensibles. El documento US 2006/0182740 desvela un procedimiento para la producción de una preparación concentrada de anticuerpo que incluye un paso de sometimiento de la preparación de anticuerpo de la filtración de membrana.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona procedimientos para la generación de soluciones de proteínas altamente concentradas, por ej., medicamentos proteicos altamente concentrados y soluciones de anticuerpos altamente concentradas. Los procedimientos de la invención implican la evaporación de la membrana, tal como la evaporación del disolvente libre de proteína de la solución de proteínas, lo que lleva a la concentración de la solución de proteínas. Los procedimientos de la presente invención dan como resultado concentraciones de la solución de proteínas no previamente alcanzables por medio de procedimientos de ultrafiltración convencionales, por ej., las concentraciones de solución de proteínas de más de aproximadamente 260 gramos de proteína por litro de solución. La invención también proporciona soluciones de proteínas altamente concentradas producidas por los procedimientos de la invención, así como también un aparato para la preparación de soluciones de proteínas altamente concentradas.

Los procedimientos de la invención pueden incluir varias formas de realización. Por lo menos una forma de realización de la invención proporciona procedimientos para la generación de soluciones de proteínas altamente concentradas en un aparato que comprende los pasos de la circulación de una primera solución de proteínas a través de un dispositivo de ultrafiltración, en el que el dispositivo de ultrafiltración comprende una membrana porosa con un lado de permeación; la aplicación de un flujo de gas al lado de permeación de la membrana porosa; y la recogida de una segunda solución de proteínas, en el que la segunda solución de proteínas es una solución de proteínas altamente concentrada. Los dispositivos de ultrafiltración usados en los procedimientos de la invención pueden ser de cualquier tipo, por ej., un dispositivo de fibra hueca; un dispositivo de placa y marco; un dispositivo de enrollado en espiral; y un dispositivo de célula agitada. En algunas formas de realización, el paso de la circulación de la primera solución de proteínas se repite antes del paso de la recogida de la segunda solución de proteínas. En algunas formas de realización, la temperatura fuera del aparato es de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 60 °C, por ej., de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C.

En algunas formas de realización de la invención, la primera solución de proteínas es una solución de anticuerpo, por ej., una solución de anticuerpo monoclonal. En algunas formas de realización, la primera solución de proteínas es una solución de proteínas terapéutica.

Las soluciones de proteínas altamente concentradas producidas por los procedimientos de la invención pueden comprender, como ejemplos no limitativos, por lo menos aproximadamente 200 g/L de proteína; por lo menos aproximadamente 260 g/L de proteína; por lo menos aproximadamente 300 g/L de proteína; por lo menos aproximadamente 350 g/L de proteína; aproximadamente 460 g/L de proteína o más; o cualquier valor intermedio.

En algunas formas de realización de la invención, los procedimientos dan como resultado menos de aproximadamente 30% de incremento, por ej., menos de aproximadamente 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, o 0,1% de incremento, en la formación de especies de alto peso molecular (HMW) en las soluciones de proteínas altamente concentradas. En algunas formas de realización de la invención, los procedimientos dan como resultado menos de aproximadamente 30% de incremento, por ej., menos de aproximadamente 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, o 0,1% de incremento, en la formación de especies de bajo peso molecular (LMW) en las soluciones de proteínas altamente concentradas.

En algunas formas de realización, los procedimientos de la invención pueden comprender además un primer paso de la generación de una solución concentrada de proteína por el uso de procedimiento(s) de ultrafiltración convencional.

En algunas formas de realización de la invención, el flujo de gas es un flujo de aire. En formas de realización adicionales, el flujo de aire se produce por un vacío. En algunas formas de realización, el flujo de aire se suministra a una presión de aproximadamente 689476 Pa o menos. En algunas formas de realización, el flujo de aire se suministra a una presión de aproximadamente 6894,76 a 13789,5 Pa. En algunas formas de realización, la membrana porosa es una membrana hidrófila; en algunas de estas formas de realización, la aplicación del flujo de gas al lado de permeación de la membrana porosa permite que una solución tampón acuosa de la primera solución de proteínas se absorba en la membrana porosa y se evapore fuera de la membrana porosa. En algunas otras formas de realización, la membrana porosa es una membrana hidrófoba.

También se desvela un aparato para la preparación de soluciones de proteínas altamente concentradas, que comprende un tanque de retención; un dispositivo de ultrafiltración con dos extremos que está conectado al tanque de retención en un extremo del dispositivo de ultrafiltración, en el que el dispositivo de ultrafiltración comprende una membrana porosa con un lado de permeación; un dispositivo para la aplicación de un flujo de gas en el lado de permeación de la membrana porosa, en el que el flujo de gas (por ej., un flujo de aire, por ej., un flujo de aire

producido por un vacío) permite que una solución tampón acuosa en el dispositivo de ultrafiltración se evapore fuera de la membrana porosa; y una salida en el extremo opuesto del dispositivo de ultrafiltración.

5 En algunas formas de realización del aparato, el flujo de aire se suministra a una presión de aproximadamente 6,9 bar (689476 Pa) o menos. En algunas formas de realización, el flujo de aire se suministra a una presión de aproximadamente 0,069 a 0,138 bar (6894,76 a 13789,5 Pa). En algunas formas de realización, la salida en el extremo opuesto del dispositivo de ultrafiltración está conectada a, y devuelve la solución de nuevo a, el tanque de retención. La membrana porosa es una membrana hidrófila.

10 La invención también proporciona soluciones de proteínas altamente concentradas producidas por los procedimientos de la invención. En algunas formas de realización, la solución de proteínas es una solución de anticuerpo, por ej., una solución de anticuerpo monoclonal. En algunas formas de realización, la solución de proteínas es una solución de proteínas terapéutica. En algunas formas de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una solución de proteínas altamente concentrada de la invención y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

15 La invención proporciona además procedimientos para la generación de soluciones de proteínas altamente concentradas, que comprende los pasos de la carga de una primera solución de proteínas en un tanque de retención ; la permisión de que la primera solución de proteínas fluya desde el tanque de retención en un dispositivo de ultrafiltración, en el que el dispositivo de ultrafiltración comprende una membrana porosa con un lado de permeación; la circulación de la primera solución de proteínas a través del dispositivo de ultrafiltración; la aplicación de un flujo de gas al lado de permeación de la membrana porosa; y la recogida de una segunda solución de proteínas, en el que la
20 segunda solución de proteínas es una solución de proteínas altamente concentrada.

Los dispositivos de ultrafiltración usados en los procedimientos de la invención pueden ser de cualquier tipo, por ej., un dispositivo de fibra hueca; un dispositivo de placa y marco; un dispositivo de enrollado en espiral; y un dispositivo de célula agitada. En algunas formas de realización, el paso de la circulación de la primera solución de proteínas se repite antes del paso de la recogida de la segunda solución de proteínas. En algunas formas de realización, la
25 temperatura fuera del aparato es de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 60 °C, por ej., aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C. En algunas formas de realización de la invención, la primera solución de proteínas es una solución de anticuerpo, por ej., una solución de anticuerpo monoclonal; en algunas formas de realización, la primera solución de proteínas es una solución de proteínas terapéutica. Las soluciones de proteínas altamente concentradas producidas por los procedimientos de la invención pueden comprender, como ejemplos no limitativos,
30 por lo menos aproximadamente 200 g/L de proteína; por lo menos aproximadamente 260 g/L de proteína; por lo menos aproximadamente 300 g/L de proteína; por lo menos aproximadamente 350 g/L de proteína; aproximadamente 460 g/L de proteína o más; o cualquier valor intermedio. En algunas formas de realización de la invención, los procedimientos dan como resultado menos de aproximadamente 30% de incremento, por ej., menos de aproximadamente 5% de incremento, por ej., menos de aproximadamente 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, o 0,1% de
35 incremento, en la formación de especies de HMW y/o LMW en las soluciones de proteínas altamente concentradas.

En algunas formas de realización, los procedimientos de la invención pueden comprender además un primer paso de la generación de una solución concentrada de proteína por el uso de un procedimiento de ultrafiltración convencional. En algunas formas de realización de la invención, el flujo de gas es un flujo de aire. En formas de
40 realización adicionales, el flujo de aire se produce por un vacío. En algunas formas de realización, el flujo de aire se suministra a una presión de aproximadamente 689476 Pa o menos; en algunas formas de realización, el flujo de aire se suministra a una presión de aproximadamente 6894,76 a 13789,5 Pa. En algunas formas de realización, la membrana porosa es una membrana hidrófila; en algunas de estas formas de realización, la aplicación del flujo de gas al lado de permeación de la membrana porosa permite que una solución tampón acuosa de la primera solución de proteínas se absorba en la membrana porosa y se evapore fuera de la membrana porosa. En algunas otras
45 formas de realización, la membrana porosa es una membrana hidrófoba.

Breve descripción de las figuras

La **FIG. 1** representa un aparato de ejemplo para su uso en el procedimiento de la invención.

La **FIG.2** representa un aparato para llevar a cabo un procedimiento de ultrafiltración (UF) convencional.

50 La **FIG. 3** representa el incremento de la viscosidad de la solución de proteínas (Eje Y; [cP]) con la concentración creciente de proteínas en una solución de proteínas (Eje X; (g/L)) concentrada por el uso de un dispositivo de ultrafiltración de fibra hueca (rombos abiertos) o un dispositivo de ultrafiltración de célula agitada (triángulos abiertos).

La **FIG.4** es una comparación esquemática entre la técnica de evaporación por membrana de ultrafiltración (UF) por el uso de una membrana de UF hidrófila (**FIG. 4A**) y la técnica de evaporación por membrana hidrófoba por el uso de una membrana microporosa hidrófoba (**FIG. 4B**).

La **FIG. 5** representa el incremento de la viscosidad de una solución de proteínas de fusión de Fc (Eje Y; [cP]) con la concentración creciente de proteínas en una solución de proteínas (Eje X; (g/L)) concentrada por el uso de un

dispositivo de ultrafiltración de célula agitada.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para la generación de soluciones de proteínas altamente concentradas, por ej., una solución de proteínas terapéutica, una solución de anticuerpo, etc. De manera más específica, los procedimientos de la presente invención pueden incluir los pasos de la circulación de una primera solución de proteínas a través de un dispositivo de ultrafiltración, en el que el dispositivo de ultrafiltración es, por ej., un dispositivo de fibra hueca, un dispositivo de placa y marco, un dispositivo de enrollado en espiral, un dispositivo de célula agitada, etc., y en el que el dispositivo de ultrafiltración comprende una membrana porosa; la aplicación de un flujo de gas, por ej., un flujo de aire, hacia el lado de permeación de la membrana porosa; y la recogida de una segunda solución de proteínas desde el aparato, en el que la segunda solución de proteínas es una solución de proteínas altamente concentrada. También se desvela un aparato para la generación de soluciones de proteínas altamente concentradas, soluciones de proteínas producidas por los procedimientos de la presente invención, y composiciones farmacéuticas que comprenden soluciones de proteínas altamente concentradas.

Soluciones de Proteínas

Las soluciones usadas en la presente invención pueden incluir soluciones de proteínas. Como se usa en la presente memoria y por lo general se entiende en la técnica, los términos "proteína" o "proteína de interés" se refieren a por lo menos una cadena de aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos secuenciales, y por lo general es sinónimo de "polipéptido" o "polipéptido de interés". En ciertas formas de realización, una proteína de la presente invención puede ser codificada por una secuencia de ADN exógeno (es decir, exógeno a la célula que produce la proteína). Esta secuencia puede ser una secuencia que se produce en la naturaleza, o de manera alternativa puede ser una secuencia manipulada por el hombre. De manera alternativa, una proteína de la presente invención puede ser codificada por una secuencia de ADN endógeno.

Los procedimientos de la presente invención se pueden usar para concentrar soluciones de cualquier proteína de interés que incluyen, pero no se limitan a, proteínas que tienen propiedades farmacéuticas, de diagnóstico, agrícolas, y/o cualquiera de una variedad de otras propiedades que son útiles en aplicaciones comerciales, experimentales, y/u otras aplicaciones. Además, una proteína de interés puede ser una proteína terapéutica. Una "medicamento proteico" (o una "proteína terapéutica") es, por ejemplo, una proteína que tiene un efecto biológico en el cuerpo, o en una región en el cuerpo sobre el que actúa directamente, o en una región del cuerpo en que actúa de forma remota a través de intermedios, etc. En ciertas formas de realización, las proteínas concentradas por el uso de procedimientos de la presente invención se pueden procesar y/o modificar antes de administrarse a un sujeto como una proteína terapéutica.

La presente invención se puede usar para concentrar cualquier proteína terapéutica, tales como enzimas, receptores, fusiones de receptores, receptores solubles, fusiones de receptores solubles, anticuerpos (por ej., anticuerpos monoclonales y/o policlonales), fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo, proteínas de fusión Fc, SMIP, citoquinas, hormonas, factores de regulación, factores de crecimiento, factores de coagulación, y agentes de unión a antígeno farmacéuticamente o comercialmente relevantes. La lista anterior de las proteínas es de naturaleza meramente ejemplar, y no pretende ser una recitación limitante. Los expertos ordinarios en la técnica conocerán otras proteínas (o moléculas similares a proteínas) que pueden ser concentradas de acuerdo con la presente invención, y serán capaces de usar los procedimientos desvelados en la presente memoria para concentrar dichas proteínas o similares.

En ciertas formas de realización de la invención, la proteína a ser concentrada en la solución de proteínas es un anticuerpo. El término anticuerpo incluye una proteína que comprende por lo menos uno y de manera típica dos dominios VH o porciones de los mismos, y/o por lo menos uno y de manera típica dos dominios VL o porciones de los mismos. En ciertas formas de realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas de inmunoglobulina pesadas y dos cadenas de inmunoglobulina ligeras, en el que las cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras están interconectadas por, por ej., enlaces disulfuro. Los anticuerpos, o una porción del mismo, se pueden obtener de cualquier origen, que incluyen, pero no se limitan a, roedores, primates (por ej., primates humanos y no humanos), camélidos, tiburones, así como también producidos de forma recombinante, por ej., quiméricos, humanizados, y/o generados in vitro, por ejemplo, por procedimientos muy conocidos por los expertos en la técnica.

Esta invención también abarca "fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos", que incluyen, pero no se limitan a, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL, y CHI; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CHI; (iv) un fragmento Fv, que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; (vi) un dominio variable de camélido o camelizado, por ej., un dominio VHH; (vii) una Fv de cadena única (scFv); (viii) un anticuerpo biespecífico; y (ix) uno o más fragmentos de unión a antígenos de una inmunoglobulina fusionada a una región Fc. Además, si bien los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, por el uso de procedimientos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite ser hechos como una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas

monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ej., Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423 a 426; Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879 a 5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también están destinados a ser abarcados dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen por el uso de técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se evalúan para la función de la misma manera que los anticuerpos intactos.

La invención también abarca anticuerpos de dominio único. Los anticuerpos de dominio único pueden incluir anticuerpos cuyas regiones determinantes de complementariedad son parte de un polipéptido de dominio único. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos naturalmente desprovistos de cadenas ligeras, anticuerpos de dominio único derivados de anticuerpos convencionales de cuatro cadenas, anticuerpos manipulados y andamios de dominio único distintos de los derivados de anticuerpos. Los anticuerpos de dominio único pueden ser cualquiera de la técnica o cualquiera de los anticuerpos de dominio único futuros. Los anticuerpos de dominio único se pueden derivar de cualquier especie, que incluyen, pero no se limitan a, ratón, ser humano, camello, llama, cabra, conejo, vaca y tiburón. De acuerdo con un aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio único, como se usa en la presente memoria, es un anticuerpo de dominio único natural conocido como un anticuerpo de cadena pesada desprovisto de cadenas ligeras. Tales anticuerpos de dominio único se revelan en, por ej., el documento WO 94/004678. Por razones de claridad, este dominio variable derivado de un anticuerpo de cadena pesada naturalmente desprovisto de cadena ligera se conoce en la presente memoria como un VHH o nanoanticuerpo para distinguirlo del VH convencional de inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Tal molécula de VHH se puede derivar de anticuerpos producidos en las especies de *Camelidae*, por ejemplo, en camello, llama, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies además de *Camelidae* pueden producir anticuerpos de cadena pesada naturalmente desprovistos de cadena ligera; tales VHH están dentro del alcance de la invención. Los anticuerpos de dominio único también incluyen IgNAR de tiburón; véase, por ej., Dooley *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:1846 a 1851.

Aparte de anticuerpos "bienespecíficos" o "bifuncionales", se entiende que un anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo "bienespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos bienespecíficos se pueden producir por medio de una variedad de procedimientos que incluyen fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab' (véase, por ej., Songvilai y Lachmann (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79:315 a 321; Kostelny *et al.*, (1992). *J Immunol.* 148:1547 a 1553).

En formas de realización en las que la proteína es un anticuerpo o un fragmento del mismo, la proteína puede incluir por lo menos una o dos cadenas pesadas de longitud completa, y por lo menos una o dos cadenas ligeras. De manera alternativa, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden incluir solamente un fragmento de unión a antígeno (por ej., un Fab, F(ab')₂, Fv, o un fragmento Fv de cadena única). El mismo anticuerpo o fragmento puede ser un anticuerpo monoclonal o de especificidad única. El anticuerpo o fragmento del mismo también puede ser un anticuerpo de ser humano, humanizado, quimérico, injertado con CDR, o en generado *in vitro*. En aún otras formas de realización, el anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada seleccionada entre, por ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En otra forma de realización, el anticuerpo tiene una cadena ligera seleccionada entre, por ej., kappa o lambda. En por lo menos una forma de realización, la región constante se altera, por ej., muta, para modificar las propiedades del anticuerpo (por ej., para incrementar o disminuir uno o más de: la unión del receptor Fc, la glicosilación de anticuerpos, el número de residuos de cisteína, la función de célula efectora, o la función de complemento). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento del mismo se une de manera específica a un antígeno predeterminado, por ej., un antígeno asociado con un trastorno, por ej., un trastorno neurodegenerativo, metabólico, inflamatorio, autoinmune, y/o maligno.

Las proteínas descritas en la presente memoria pueden, de manera opcional, incluir además una fracción que mejora uno o más de, por ej., la estabilidad, la función de la célula efectora o la fijación del complemento. Por ejemplo, un anticuerpo o proteína de unión a antígeno pueden incluir además un resto pegilado, albúmina, o una región constante de cadena pesada y/o de cadena ligera.

Los anticuerpos se hacen por lo general, por ejemplo, a través de técnicas de hibridoma tradicionales (por ej., Kohler *et al.*, (1975) *Nature* 256:495 a 499), procedimientos de ADN recombinante (por ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567), o técnicas de presentación en fagos por el uso de bibliotecas de anticuerpo (por ej., Clackson *et al.*, (1991) *Nature* 352:624 a 628; Marks *et al.*, (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581 a 597). Los anticuerpos a concentrarse por el uso de los procedimientos de la presente invención pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales son conocidos en la técnica. Para diversas otras técnicas de producción de anticuerpos, véase, por ej., *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) eds. Harlow *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory.

Además, los anticuerpos pueden ser marcados con una etiqueta detectable o funcional. Estas etiquetas incluyen radiomarcadores (por ej., ¹³¹I o ⁹⁹Tc), marcadores enzimáticos (por ej., peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina), y otros restos químicos (por ej., biotina).

Los fármacos de "módulo pequeño inmunofarmacéutico" o SMIP™ (Trubion Pharmaceuticals, Seattle, WA) son polipéptidos de cadena sencilla compuestos por un dominio de unión para una estructura afín tal como un antígeno,

un contra-receptor o similar, un polipéptido de la región bisagra que tiene ya sea residuos de una o ninguna de cisteína, y dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina (véase también trubion.com). Los SMIP y sus usos y aplicaciones se desvelan en, por ej., las Solicitudes de Patente Publicadas de los Estados Unidos Núms. 2007/002159, 2003/0118592, 2003/0133939, 2004/0058445, 2005/0136049, 2005/0175614, 2005/0180970, 2005/0186216, 2005/0202012, 2005/0202023, 2005/0202028, 2005/0202534, y 2005/0238646, y miembros de la familia de patentes relacionadas con los mismos.

Una solución de proteínas se somete a los procedimientos para la generación de una solución de proteínas altamente concentrada de la presente invención, por ej., se puede obtener una primera solución de proteínas, como resultado de la purificación de las proteínas expresadas de manera endógena o exógena, por ej., una proteína recombinante producida de manera exógena. Los expertos en la técnica sabrán las células y los procedimientos de cultivo de células que son óptimos para la producción de una proteína particular.

De manera alternativa, una proteína de la solución de proteínas usada para la generación de una solución de proteínas altamente concentrada se puede obtener por medio de síntesis de proteínas química. Las técnicas para la síntesis química se conocen por lo general en la técnica, por ejemplo, un sintetizador de péptidos automatizado disponible comercialmente tal como los fabricados por Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA).

Para las proteínas de interés producidas por el uso de procedimientos de cultivo celular, al final del cultivo celular, las proteínas se pueden recoger y purificadas con el fin de obtener la primera solución de proteínas, es decir, la solución de proteínas a ser sometido a los procedimientos de la presente invención para la generación de una solución de proteínas altamente concentrada de la presente invención. Las formas solubles de las proteínas se pueden purificar a partir de medios condicionados. Los ejemplos de formas solubles de proteínas incluyen citocinas, proteínas de fusión de receptor soluble, anticuerpos, etc. Las formas unidas a membrana del polipéptido se pueden purificar por medio de la preparación de una fracción de membrana total a partir de las células de expresión y la extracción de las membranas con un detergente no iónico tal como TRITON® X-100 (EMD Biosciences, San Diego, CA). Las proteínas citosólicas o nucleares se pueden preparar por medio de la lisis de las células huésped (por medio de fuerza mecánica, bomba de Parr, ultrasonidos, detergentes, etc.), la eliminación de la fracción de la membrana celular por medio de centrifugación y la retención del sobrenadante.

El polipéptido se puede purificar por el uso de otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido producido por los procedimientos desvelados se puede concentrar por el uso de un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración AMICON® o PELLICON® (Millipore, Billerica, MA). Luego del paso de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación tal como un medio de filtración en gel. De manera alternativa, se puede emplear una resina de intercambio aniónico (por ej., una columna MonoQ, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); tal resina contiene una matriz o sustrato que tiene grupos colgantes de dietilaminoetil (DEAE) o polietilenimina (PEI). Las matrices usadas para la purificación pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en purificación de proteínas. De manera alternativa, se puede usar un paso de intercambio catiónico para la purificación de proteínas. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo (por ej., columnas de S-SEPHAROSE ©, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

La purificación del polipéptido a partir del sobrenadante del cultivo también puede incluir uno o más pasos de columna sobre resinas de afinidad, tales como concanavalina A-agarosa, AF-HEPARIN650, heparina-TOYOPEARL® o Cibacron azul 3GA SEPHAROSE® (Tosoh Biosciences, San Francisco, CA); columnas de cromatografía de interacción hidrófoba por el uso de resinas tales como fenil éter, butil éter, o propil éter; o columnas de afinidad inmune por el uso de anticuerpos frente a la proteína marcada. Finalmente, se pueden emplear uno o más pasos de HPLC que emplean medios de HPLC hidrófobos, por ej., gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos (por ej., columnas de Ni-NTA), para purificar de manera adicional la proteína. De manera alternativa, los polipéptidos se pueden expresar de forma recombinante en una forma que facilita la purificación. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden expresar como una fusión con proteínas tales como la proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST) o tiorredoxina (TRX); kits para la expresión y purificación de tales proteínas de fusión están disponibles comercialmente de New England Biolabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ), e Invitrogen (Carlsbad, CA), respectivamente. Las proteínas también se pueden etiquetar con un pequeño epítipo (por ej., etiquetas His, myc o Flag) y posteriormente identificarse o purificarse por el uso de un anticuerpo específico para el epítipo seleccionado. Los anticuerpos frente a epítopos comunes están disponibles de numerosas fuentes comerciales.

En formas de realización de la presente invención en la que la solución de proteínas para ser usada en la generación de una solución de proteínas altamente concentrada es una solución de anticuerpo, la solución puede haber sido obtenida por medio de la purificación de anticuerpos a partir de, por ej., sueros de animales, sobrenadante de cultivo de células de hibridoma, fluido de ascitis, etc., por el uso de, por ej., procedimientos convencionales para la purificación de anticuerpos (Cromatografía de Proteína A, Cromatografía de Proteína G, etc.). Los procedimientos para la purificación de anticuerpos se describen de manera adicional en *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) eds. Harlow *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory.

Una solución tampón acuosa en una solución de proteínas que se usa para la generación de una solución de

5 proteínas altamente concentrada puede ser un tampón de elución final a partir de cualquiera de los pasos de purificación anteriores. De manera alternativa, un tampón de elución final a partir de cualquiera de los pasos de purificación anteriores se puede reemplazar, por ej., por medio de intercambio de tampón, en cualquier tampón adecuado, por ej., 12 mM de histidina, pH 5.9. Los expertos en la técnica sabrán cuáles procedimientos se pueden usar para llevar a cabo intercambios de tampón de una solución de proteínas.

Algunos o todos los pasos de purificación anteriores en varias combinaciones, ya sea con o sin otros procedimientos conocidos, se pueden emplear para purificar una proteína de interés y generar una primera solución de proteínas antes de la generación de una solución de proteínas altamente concentrada de la presente invención.

Aparato para la Generación de Soluciones de Proteínas Altamente Concentradas

10 En algunas formas de realización, el aparato para su uso con el procedimiento de la presente invención puede comprender un tanque de retención, un dispositivo de ultrafiltración conectado al tanque de retención en un extremo del dispositivo de ultrafiltración, y una salida en un segundo extremo del dispositivo de ultrafiltración. En algunas formas de realización, la salida vuelve de nuevo al tanque de retención.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "material retenido" significa la porción de una muestra o solución que se retiene sustancialmente por el aparato (algunas veces se denomina como el material concentrado); en otras palabras, el material retenido es la porción de la muestra o solución que permanece en el lado corriente arriba de la membrana. De este modo, un "tanque de retención" se refiere a un tanque que contiene una porción de una muestra sustancialmente retenida por el aparato. Como es muy conocido para los expertos en la técnica, el tanque de retención se puede conectar de manera opcional a un tanque de alimentación, por ej., a través de un puerto de ventilación, antes y/o durante el funcionamiento del sistema.

20 Un aparato de ejemplo para su uso con el procedimiento de la invención se demuestra en la FIG. 1. En por lo menos una forma de realización, el aparato para la generación de una solución de proteínas altamente concentrada de la invención comprende un tanque de retención para la carga de una solución de proteínas a ser concentrada, es decir, una primera solución de proteínas. El tanque de retención puede ser de cualquier tipo conocido por los expertos ordinaria en la técnica, tal como un tanque de acero de fondo cónico, un tanque revestido de teflón, o una bolsa desechable de fabricantes como Millipore (Billerica, MA), Hyclone (Novato, CA), o Sartorius AG (Goettingen, Alemania).

25 La primera solución de proteínas cargada en el tanque de retención es una proteína en un tampón acuoso, tal como la elución final a partir de cualquiera de los pasos de purificación descritos con anterioridad, o cualquier otro tampón adecuado.

El tanque de retención del aparato se puede conectar a un dispositivo de ultrafiltración. En por lo menos una forma de realización, el dispositivo de ultrafiltración está conectado al tanque de retención en un bucle, de forma que la primera solución de proteínas se deja volver de nuevo al tanque de retención. Esta configuración permite de manera opcional la recirculación continua de la solución a lo largo de todo el aparato.

35 El dispositivo de ultrafiltración puede ser de cualquier tipo conocido por los expertos ordinaria en la técnica, tal como, sin limitación, un dispositivo de fibra hueca, un diseño o dispositivo de placa y marco, una célula agitada, un dispositivo de enrollado en espiral, etc. Un dispositivo de fibra hueca consiste en un haz de fibras conservadas en los extremos en un epoxi o un material similar para formar una lámina de tubos. El dispositivo de fibra hueca es operado por medio del flujo de alimentación en el lado del tubo, con la corriente de material filtrado eliminada en la dirección radial al lado de la carcasa. Un dispositivo de placa y marco consiste en membranas de lámina plana apiladas entre las placas de soporte. Un dispositivo de célula agitada consiste en un contenedor en el cual el cizallamiento y la mezcla de proteínas se consiguen por medio de la agitación rápida de la solución inmediatamente adyacente a la membrana, de manera típica por el uso de una barra o impulsor de agitación. Un dispositivo de enrollado en espiral usa pares de membranas de láminas planas delimitadas un material filtrado de malla porosa y espaciadores de alimentación en los lados corriente arriba y corriente abajo, enrollados alrededor de un tubo central de recogida del material filtrado.

40 En ciertas formas de realización, el dispositivo de ultrafiltración es un dispositivo de fibra hueca, que comprende una membrana porosa, por ej., una membrana porosa de fibra hueca. En la invención, la membrana es una membrana hidrófila, por ej., una membrana porosa de fibra hueca, tal como un cartucho de fibra hueca de 30 kDa de polisulfona (GE Healthcare, Westborough, MA). Por lo tanto, la membrana porosa permite la absorción del disolvente libre de proteínas (por ej., tampón acuoso) en los poros de la membrana por acción capilar (es decir, fuerzas de capilaridad).

El tamaño de los poros de la membrana porosa se selecciona de forma que el tampón acuoso de la solución de proteínas, por ej., una primera solución de proteínas se deja absorber en la membrana, mientras que la proteína se retiene en el interior del dispositivo de ultrafiltración.

55 De manera adicional, el aparato comprende un dispositivo para la aplicación de un flujo de gas (por ej., aire, nitrógeno, vapor de agua seco, etc.) en el lado de permeación de la membrana, es decir, corriente abajo de la membrana, como se muestra en la FIG. 1. El lado de permeación de la membrana es el lado de la membrana que

permite que el tampón libre de proteína se retire de la primera solución de proteínas, por ej., se evapore de la primera solución de proteínas. Un flujo de gas aplicado al lado de permeación de la membrana se puede generar por el uso de, por ej., un compresor, un tanque de aire comprimido, un ventilador, un dispositivo que calienta el aire/gas para generar flujo, una bomba de vacío, etc. En por lo menos una forma de realización, el flujo de gas se aplica a través del lado de permeación de la membrana porosa de fibra hueca.

Los procedimientos de la invención pueden incluir formas de realización en las que un flujo de gas aplicado en el lado de permeación de la membrana es un flujo de aire. El flujo de aire se puede aplicar y/o producir por medio de cualquier dispositivo, procedimiento o forma de generar un flujo de aire conocido para los expertos ordinaria en la técnica, tal como, pero no limitado a, un compresor, un tanque de aire comprimido, un ventilador, un dispositivo que calienta el aire para generar flujo, y/o una bomba de vacío. En por lo menos una forma de realización, el flujo de aire es creado por el soplado de aire ambiente (hogareño) con una presión de entrada de 6894,76 a 13789,5 Pa, si bien se pueden usar presiones de hasta los límites tolerados por los dispositivos de filtro, por ej., hasta aproximadamente 689476 Pa. De manera adicional, el aparato se puede conectar a una bomba de alimentación que bombea la solución de proteínas a través del aparato.

Un aparato para su uso en el procedimiento de la invención puede comprender de manera opcional un dispositivo o manera de conmutar el modo de funcionamiento de un procedimiento de ultrafiltración convencional, tal como el representado en la FIG. 2, a un procedimiento de la presente invención, es decir, procedimientos impulsados por evaporación. Por lo tanto, en algunas formas de realización, el aparato puede ser operado en un modo de ultrafiltración convencional hasta que el flujo de material permeado se aproxime a cero. Este punto se denomina menudo como el punto de gel. En ese punto, el aparato se puede conmutar a un procedimiento de la presente invención. De manera alternativa, se puede usar un primer aparato para concentrar la proteína en un modo de ultrafiltración convencional y entonces el fluido se puede transferir a un segundo aparato usado para concentrar la proteína con base en un procedimiento de la invención.

Los expertos en la técnica serán conscientes, con base en la descripción general del aparato para su uso en el procedimiento de la invención en la presente memoria, de otras modificaciones posibles que se pueden hacer al aparato.

Procedimientos para la Generación de Soluciones de Proteínas Altamente Concentradas

En por lo menos una forma de realización de la presente invención, los procedimientos para la generación de soluciones de proteínas altamente concentradas incluyen los pasos de la circulación de una primera solución de proteínas a través de un dispositivo de filtración, tal como un dispositivo de ultrafiltración, en el que el dispositivo de ultrafiltración comprende una membrana porosa; la aplicación de un flujo de gas, por ej., un flujo de aire, hacia el lado de permeación de la membrana porosa, es decir, el lado corriente abajo de la membrana en el dispositivo de ultrafiltración; y la recogida de una segunda solución de proteínas desde el aparato, en el que la segunda solución de proteínas es una solución de proteínas altamente concentrada.

En otra forma de realización, el procedimiento comprende la carga de una primera solución de proteínas en un tanque de retención; la permisión de que la primera solución de proteínas fluya desde el tanque de retención en un dispositivo de ultrafiltración, en el que el dispositivo de ultrafiltración comprende una membrana porosa; el filtrado de la primera solución de proteínas con el dispositivo de ultrafiltración; la aplicación de un flujo de gas, por ej., un flujo de aire, hacia el lado de permeación de la membrana porosa, es decir, corriente abajo de la membrana en el dispositivo de ultrafiltración; y la recogida de una segunda solución de proteínas desde el aparato, en el que la segunda solución de proteínas es una solución de proteínas altamente concentrada.

El paso de la permisión de que una primera solución de proteínas ingrese en el dispositivo de ultrafiltración de un tanque de retención puede comprender, por ej., la apertura de una válvula entre el tanque de retención y el dispositivo de ultrafiltración, y la permisión o el forzado de la primera solución de proteínas para que entre en el dispositivo de ultrafiltración a un caudal de flujo. En por lo menos una forma de realización, el paso de la permisión de que la primera solución de proteínas ingrese en el dispositivo de ultrafiltración desde el tanque de retención comprende el encendido de una bomba peristáltica (por ej., una bomba de alimentación) situada entre el tanque de retención y el dispositivo de ultrafiltración. El caudal de flujo, por ejemplo, la velocidad de la bomba peristáltica puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 10.000 litros por metro cuadrado de área de membrana por hora.

Los procedimientos de la invención pueden incluir formas de realización en las que una solución de proteínas se bombea en el dispositivo de ultrafiltración a alta presión. En por lo menos una forma de realización, el dispositivo de ultrafiltración comprende una membrana porosa, por ej., una membrana porosa de fibra hueca, de forma que la membrana porosa absorba el disolvente libre de proteínas (por ej., un tampón acuoso) de la primera solución de proteínas. Los procedimientos de la invención pueden incluir formas de realización en las que el disolvente libre de proteínas se absorbe en la membrana por fuerzas capilares (o fuerzas de capilaridad), que de manera típica son más altas que las fuerzas que se pueden crear por medio de la presurización del lado de retención de la membrana (es decir, el lado interior o corriente arriba de la membrana). La exposición del lado de permeación de la membrana a un flujo de gas (por ej., un flujo de aire) permite la evaporación del disolvente libre de proteína absorbido en el aire; tal evaporación gradual y la eliminación del disolvente concentra la solución de proteínas, mientras que la membrana

impide que la proteína se exponga a interfases de aire, que se sabe que potencialmente daña las proteínas. El aire que fluye a través del lado corriente abajo de la membrana, es decir, el lado de permeación de la membrana permite una evaporación más rápida del disolvente libre de proteínas de la membrana. En por lo menos una forma de realización de la invención, el flujo de aire, por ej., de un suministro de aire ambiente (hogareño), se suministra a una presión de aproximadamente 0,069 a 0,138 bar (6894,76 a 13789,5 Pa).

En algunas formas de realización de la invención, el aire que fluye a través del lado de permeación de la membrana se mantiene a una temperatura ambiente, por ej., aproximadamente 25 °C. La solución de proteínas dentro del aparato de manera típica se mantiene a una temperatura que mejor retiene la estabilidad de las proteínas, por ej., una temperatura en el intervalo de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 45 °C, por ej., entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 35 °C. En algunas formas de realización, la temperatura fuera del aparato se mantiene a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 60 °C, por ej., entre aproximadamente 2 °C a aproximadamente 45 °C, por ej., entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 45 °C. Se puede aplicar calor al sistema, o simplemente al lado de permeación de la membrana, por el uso de, por ej., elementos de calefacción eléctrica en o cerca del dispositivo de ultrafiltración o el tanque de retención, aire caliente o vapor seco en el lado de permeación de la membrana, una fuente de radiación tal como una lámpara de calor, etc. A temperaturas más altas, la evaporación se producirá con mayor rapidez, la solución será menos viscosa, y la transferencia de masa de proteína dentro del dispositivo mejorará. Estos beneficios deben ser sopesados frente a cualquier posible problema de estabilidad de la proteína que pueda existir a temperaturas más altas. Los expertos en la técnica entenderán que, dependiendo del origen y el uso de la proteína, la temperatura a la que la proteína es estable será diferente; por lo tanto, los expertos en la técnica sabrán, a cuál temperatura mantener la solución de proteínas en el interior del aparato.

En algunas formas de realización de los procedimientos de la invención, la primera solución de proteínas circula a través del dispositivo de ultrafiltración. Los procedimientos de la invención pueden incluir formas de realización en las cuales la solución de proteínas se devuelve al tanque de retención. En ese momento, el material retenido, es decir, la solución de proteínas que queda en el aparato se puede recoger. De manera alternativa, la solución de proteínas se puede devolver al tanque de retención y dejarse recircular a través del dispositivo de ultrafiltración. En por lo menos una forma de realización de la invención, se permite que la primera solución de proteínas recircule de manera continua a través del dispositivo de ultrafiltración.

Cuando la solución de proteínas en el interior del aparato alcanza un valor de concentración deseado o una presión de alimentación deseada, la recirculación se puede desacelerar y la solución de proteínas altamente concentrada, es decir, una segunda solución de proteínas se puede recoger. La solución de proteínas altamente concentrada es por lo menos aproximadamente 200 g/L, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 260 g/l, aproximadamente 300 g/l, aproximadamente 350 g/L, o aproximadamente 460 g/L o mayor.

Los expertos en la técnica entenderán que la concentración de proteínas se puede medir por el uso de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, tales como espectrofotometría UV o ELISA. En algunas formas de realización de la invención, la concentración de proteínas se mide por medio de absorbancia de luz ultravioleta con una longitud de onda de 280 nm. La medición se corrige de manera típica para la presencia de partículas grandes por medio de la resta de la señal de absorbancia a 320 nm. Después de que la proteína se concentra y se recupera, la proteína se puede caracterizar por el uso de una variedad de procedimientos para asegurar que la calidad de la proteína no se vea afectada. El porcentaje de proteína que son especies de alto y bajo peso molecular se puede determinar por el uso de cromatografía por exclusión de tamaño. Un ensayo de bioactividad se puede usar para determinar si la proteína todavía retiene la capacidad de llevar a cabo la función biológica deseada. La proteína se puede caracterizar con espectrometría de masas, SDS-PAGE, geles de enfoque isoeléctrico (IEF, por su sigla en inglés), cromatografía de intercambio iónico, o electroforesis capilar para determinar si existe algún impacto a los aminoácidos, las cadenas de aminoácidos, o los componentes de polisacáridos. La estructura de la proteína se puede caracterizar por el uso de técnicas tales como calorimetría diferencial de barrido, barridos UV cercanos y lejanos, y dicroísmo circular.

Los procedimientos de la invención pueden incluir formas de realización en las cuales la presión de alimentación inicial en el aparato es por lo menos aproximadamente 34473,8 Pa, por ej., entre aproximadamente 34473,8 Pa y el límite máximo de presión de alimentación del dispositivo, y la primera solución de proteínas se recircula a través del dispositivo de ultrafiltración. Cuando se opera a un caudal de flujo de alimentación fija, la viscosidad y la alimentación a presión incrementarán a medida que la proteína se concentra. Cuando la presión de alimentación alcanza el límite del dispositivo, el caudal de flujo de alimentación se puede disminuir para mantener la presión de alimentación cerca del valor máximo. Para evitar que la solución de proteínas se vuelva demasiado viscosa o seca en el dispositivo de filtro, el caudal de flujo de alimentación debe exceder de manera significativa, por ej., exceder por al menos aproximadamente dos veces, el caudal al que el disolvente se evapora en el lado de permeación de la membrana. El experimento de concentración ("experimento") cuando (1) la presión de alimentación se encuentra cerca del límite del dispositivo de filtro mientras que el caudal de flujo de alimentación es menor que el doble del caudal de flujo del material permeado, (2) se alcanza el límite de tiempo de proceso, o (3) se consigue la diana de concentración de proteínas.

Los procedimientos de concentración de proteínas pueden conducir a la formación de agregados de proteínas en la

solución, tales como agregados de bajo peso molecular y de alto peso molecular. Tales agregados producen productos de proteínas no funcionales, subóptimos o no deseados.

Los términos "agregados de bajo peso molecular" o "especies de bajo peso molecular" (abreviado como LMW) se refieren a proteínas que parecen tener un peso molecular más bajo que la proteína de interés. LMW pueden ser fragmentos de la proteína de interés o fragmentos de otras especies de los medios, células huésped, o componentes de la solución. Los términos "agregados de alto peso molecular" o "especies de alto peso molecular" (HMW) se refieren a un subproducto indeseable de la producción de proteínas que resulta de la asociación entre por lo menos dos proteínas. Los HMW pueden ser una asociación entre por lo menos dos de las mismas proteínas y/o una asociación entre la proteína de interés y otras proteínas o fragmentos. La asociación puede surgir por cualquier procedimiento que incluyen, pero no se limitan a, covalente, no covalente, disulfuro, y/o reticulación no reducible. Los expertos en la técnica entenderán que cuando una proteína está activa en una forma de multímeros (por ej., una forma de dímero), es decir, cuando se requiere más de una cadena polipeptídica para actividad de la proteína, el término "agregados de alto peso molecular" y similares se referirá a una asociación entre dos o más de tales formas multiméricas. Los expertos en la técnica conocerán las técnicas necesarias para monitorear y afectar a la producción de ambos agregados de bajo y alto peso molecular, por ej., cromatografía líquida de alto rendimiento por exclusión de tamaño (SEC-HPLC).

Los procedimientos para la generación de una solución de proteínas altamente concentrada de la presente invención dan como resultado pequeños incrementos tanto de agregados HMW como LMW. En algunas formas de realización de la invención, los procedimientos dan como resultado menos de aproximadamente 30% de incremento en la formación de agregados de HMW y/o LMW, por ej., incremento de menos de aproximadamente 5% en la formación de agregados de HMW y/o LMW, por ej., menos de aproximadamente incremento del 2,2% en la formación de agregados de HMW y/o LMW.

Los expertos en la técnica sabrán que es importante controlar el pH de un conjunto de ultrafiltración (es decir, un conjunto de soluciones que se obtiene después de un proceso de purificación completo, que incluyen un paso de ultrafiltración) para asegurar la calidad y la estabilidad de las proteínas. Los desequilibrios en el pH y la concentración de soluto pequeño pueden existir entre la solución de material permeado y la solución concentrada de proteína después de un paso de ultrafiltración convencional debido al efecto Donnan, como se describe por, por ej., Stoner *et al.* (2004) *J. Pharm. Sci.* 93:2332 a 2342. De acuerdo con el efecto Donnan, la electroneutralidad se mantiene a ambos lados de la membrana, y existe un potencial equiquímico a través de la membrana para cada par de contra-ión. Tal electroneutralidad conduce a la retención de pequeños iones que tienen una carga opuesta a la de la proteína, y el pasaje de solutos incrementado con la misma carga que la proteína, lo que provoca una diferencia de pH entre el lado de retención y el material permeado de la membrana (es decir, entre los lados corriente arriba y corriente abajo), lo que da como resultado fluctuaciones del pH del material retenido. El desplazamiento en pequeñas concentraciones de solutos se puede atribuir de manera secundaria al volumen excluido de la proteína y la unión solutos y proteínas. Los procedimientos de concentración de proteínas de acuerdo con la presente invención no conducirán a las fluctuaciones en el pH del material retenido porque los iones pequeños son retenidos en el interior del dispositivo de ultrafiltración y de manera típica no se evaporan con el disolvente.

Los procedimientos de la presente invención permiten la concentración de una proteína, por ej., un anticuerpo monoclonal, a por lo menos aproximadamente 200 g/L, por ej., por lo menos aproximadamente 260 g/l, aproximadamente 300 g/l, aproximadamente 350 g/L, o aproximadamente 460 g/L o mayor. La presión capilar que atrae el agua en los poros de la membrana porosa de fibra hueca es por lo menos un orden de magnitud mayor que la presión osmótica en una solución concentrada de proteína. Esto provoca que el agua fluya fuera de incluso las soluciones de proteínas más concentradas. El disolvente libre de proteína en los poros de la membrana se evapora en el aire, de manera independiente de las concentraciones de proteínas de corriente arriba. Estos dos efectos permiten que los procedimientos de la presente invención logren concentraciones de proteínas que no son posibles con los sistemas de ultrafiltración presurizados convencionales, tales como el sistema convencional representado en la FIG. 2.

En por lo menos una forma de realización de la invención, la solución de proteínas concentrada por el uso de procedimientos de la invención es una solución de anticuerpo. La solución de anticuerpo concentrada por tales procedimientos puede ser una solución de anticuerpo monoclonal. En otras formas de realización, la solución de proteínas concentrada es una solución de proteínas terapéutica, por ej., en el que la proteína en la solución de proteínas es una proteína terapéutica.

Los expertos en la técnica entenderán que cualquier solución se puede concentrar por el uso de los procedimientos de la invención, si bien en formas de realización particulares la solución concentrada es una solución de proteínas. Por ejemplo, las soluciones a ser concentradas pueden incluir soluciones de bebidas, tales como zumo o leche. Los expertos en la técnica comprenderán que, con el fin de concentrar un soluto de interés en una solución, la membrana porosa de fibra hueca debe ser impermeable al soluto de interés. La concentración de soluciones distintas de soluciones de proteínas por el uso de los procedimientos descritos en la presente memoria está contemplada por la presente invención.

Los expertos en la técnica serán conscientes, con base en la descripción general de los procedimientos de la

invención en la presente memoria, de otras posibles alteraciones que se pueden hacer a los procedimientos. Tales alteraciones de los procedimientos son abarcadas por la presente invención.

Composiciones farmacéuticas

5 En ciertas formas de realización de la invención, una solución concentrada de proteína de acuerdo con uno o más procedimientos de la presente invención puede ser útil en la preparación de productos farmacéuticos. Las soluciones de proteínas concentradas de acuerdo con uno o más procedimientos de la invención se pueden administrar a un sujeto o pueden primero ser formuladas para la administración por cualquier vía disponible, que incluyen, pero no se limitan a, por ej., la vía parenteral (por ej., intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosal, rectal y vaginal. Las composiciones farmacéuticas de la invención de manera típica incluyen una proteína purificada expresada a partir de una línea celular de mamífero y un agente de administración (por ej., un polímero catiónico, un transportador molecular peptídico, un tensioactivo, etc.) en combinación con un vehículo aceptable para uso farmacéutico. Como se usa en la presente memoria, la expresión "vehículo aceptable para uso farmacéutico" incluye materiales no tóxicos que no interfieren de manera significativa con la eficacia / actividad biológica del componente activo, por ej., disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Las características del vehículo dependerán de la vía de administración. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

20 Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Cuando la proteína terapéutica producida de acuerdo con uno o más procedimientos de la presente invención se administra en una forma oral, la composición farmacéutica estará en forma de un comprimido, una cápsula, un polvo, una solución, una emulsión, o un elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición farmacéutica de la invención de manera adicional puede contener un vehículo sólido tal como una gelatina o un adyuvante. El comprimido, la cápsula y el polvo contendrán de aproximadamente 5% a aproximadamente 95% de agente de unión, por ej., de aproximadamente 25% a aproximadamente 90% de agente de unión.

25 Cuando la proteína terapéutica producida de acuerdo con uno o más procedimientos de la presente invención se administra en forma líquida (por ej., una solución, una emulsión, o un elixir), se puede añadir un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal, tales como aceite de sésamo, aceite de cacahuete (teniendo en consideración la aparición de reacciones alérgicas en la población), aceite mineral, aceite de soja, aceites sintéticos, y/o alcohol. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener además solución salina fisiológica, dextrosa u otras soluciones de sacáridos, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol, o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 90% en peso del agente de unión, por ej., de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% en peso del agente de unión. Los expertos en la técnica conocerán las formulaciones que se utilizarán en estos entornos.

35 Cuando la proteína terapéutica producida de acuerdo con uno o más procedimientos de la presente invención se administra por inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, la proteína terapéutica estará en la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógenos. La preparación de tales soluciones de proteínas parenteralmente aceptables, teniendo en cuenta el pH, la isotonicidad, la estabilidad y similares, está dentro de la experiencia de los en la técnica. En algunas formas de realización, una composición farmacéutica para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea puede contener, además de la proteína terapéutica, un vehículo isotónico tal como una inyección de cloruro de sodio, una inyección de Ringer, una inyección de dextrosa, una inyección de dextrosa y cloruro de sodio, una inyección de Ringer con lactato, u otro vehículo como se conoce en la técnica. La composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes u otros aditivos conocidos por los expertos en la técnica.

45 La cantidad de un polipéptido de la invención en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y la gravedad de la afección a tratar, y de la naturaleza de tratamientos anteriores a los que el paciente ha sido sometido. En última instancia, el médico tratante decidirá la cantidad de una composición farmacéutica o polipéptido de la invención con el que tratar a cada paciente individual. Inicialmente, el médico tratante administrará dosis pequeñas de una composición farmacéutica / polipéptido de la invención y observará la respuesta del paciente.

50 Las dosis más grandes de una composición farmacéutica / polipéptido de la invención se pueden administrar hasta que se obtiene el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese punto la dosis por lo general no se incrementa más. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas usadas para tratar un sujeto en necesidad del mismo deben contener de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg de un polipéptido de la invención por kg de peso corporal.

55 La duración de la terapia por vía intravenosa (i.v.) por el uso de una composición farmacéutica de la presente invención variará, dependiendo de la gravedad de la enfermedad a tratar y de la afección y la respuesta idiosincrásica potencial de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación de una composición farmacéutica o un polipéptido de la presente invención puede estar dentro del intervalo de, por ej., 1 a 12, 6 a 18, o 12 a 24 horas de la administración continua o intermitente i.v.. También se contemplan las terapias subcutáneas (s.c.) e intramusculares (i.m.), por el uso de una composición farmacéutica de la presente invención.

60

Estas terapias se pueden administrar, como ejemplos no limitativos, a diario, en forma semanal, quincenal o mensual. En última instancia, el médico tratante decidirá la duración apropiada de la terapia i.v., i.m., s.c., o terapia con una molécula pequeña, y el momento de administración de la terapia, por el uso de una composición farmacéutica de la presente invención.

- 5 Las formulaciones adicionales de las composiciones farmacéuticas que comprenden las soluciones de medicamentos proteicos concentradas por uno o más procedimientos de la presente invención serán conocidas por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica también serán conscientes de formulaciones de dosificación unitaria adecuadas para las proteínas producidas de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos

- 10 Los Ejemplos que siguen se exponen para ayudar en la comprensión de la invención, pero no pretenden, y no se deben interpretar para, limitar el alcance de la invención de ninguna manera. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de procedimientos convencionales, por ej., la clonación, la transfección, aspectos básicos de procedimientos para la sobreexpresión de proteínas en líneas celulares, y procedimientos básicos para la purificación de proteínas. Tales procedimientos son muy conocidos por los expertos ordinaria en la técnica.

15 Ejemplo 1

El objetivo de los experimentos fue de concentrar el anticuerpo monoclonal 1 (mAb1) por el uso de una técnica de evaporación por membrana en un dispositivo de ultrafiltración que comprende una membrana porosa de fibra hueca. Los tubos de fibra hueca hechos por GE Healthcare (UFP-30-E-H22LA y UFP-30-E-4MA, Westborough, MA) fueron usados en una manera consistente con la ultrafiltración (UF) tradicional (convencional), con la excepción del uso de la nueva técnica de concentración por evaporación de la presente invención.

El material mAb1 se obtuvo del conjunto que sigue a la purificación de la proteína A y se purificó de manera adicional por medio de filtración a través de una membrana Millipore A1HC (Billerica, MA). El material se intercambió con un tampón en un pH de 5,9, un tampón de 12 mM de histidina y se concentró hasta 150 g/L. Este material se usó como la carga de partida para los experimentos.

25 El material de carga se procesó por el uso de un cartucho de fibra hueca de polisulfona hidrófila de 30 kDa (GE Healthcare) con 1 mm de lumen. Se usaron membranas de área diferente para los dos experimentos (38 cm² y 420 cm²). Los nuevos filtros se enjuagaron con agua antes de su uso para eliminar la solución de almacenamiento. Se colocaron transductores de presión Becton Dickinson (Newark, DE) en los puertos de alimentación y de material retenido en el cartucho. El sistema de ultrafiltración se hizo funcionar con una bomba peristáltica SciLog (SciLog Modelo 1081, Middleton, WI). El recipiente Pall Minim de 500 ml (FS700M01, Pall, East Hills, NY) se usó como el tanque de retención y se agitó con una barra de agitación magnética. El sistema se selló a excepción de un puerto de ventilación luer en la parte superior del tanque, que estaba abierto cuando el sistema estaba en funcionamiento. Cuando no estaba en uso, el sistema estaba completamente sellado.

35 Inicialmente, la carga se concentró a través de la operación convencional del sistema de ultrafiltración (véase, por ej., la FIG. 2). El cartucho de fibra hueca se hizo funcionar con una caída de presión de canal de 68947,6 Pa y una caída de presión de transmembrana de 172369 Pa. La caída de presión del canal de alimentación incrementó a medida que la solución se concentró y se hizo más viscosa. Una vez que se alcanzó una presión de alimentación de 275790 Pa, el procedimiento de concentración se cambió a un procedimiento de evaporación por membrana de la invención (véase, por ej., la FIG. 1).

40 La operación de ultrafiltración convencional llevó la solución a aproximadamente 200 g/L, es decir, el punto de gel; por encima de 200 g/L, la viscosidad incrementó de manera exponencial, lo que limitó aún más la filtración y la concentración de proteínas (datos no mostrados).

45 Durante el procedimiento de evaporación por membrana, se sopó aire doméstico (ambiente) en el lado de permeación de la membrana con una presión de entrada de 6894,76 a 13789,5 Pa. El material de alimentación se recirculó a un caudal de flujo lento con una presión de alimentación inicial que oscilaba entre 68947,6 a aproximadamente 103421 Pa y una válvula de material retenido abierta. Este proceso de concentración se continuó hasta que la viscosidad del material provocó que la presión de alimentación excediera 275790 Pa. En este punto, el caudal de flujo de recirculación se desaceleró, y se recogió el material. Por el uso del procedimiento de evaporación por membrana de fibra hueca, la concentración final de proteína excedió la concentración máxima de proteína alcanzable con la ultrafiltración convencional, incluso con una viscosidad de la solución incrementada de manera significativa (FIG. 3; Fibra Hueca).

50 Las concentraciones finales para el Experimento 1 y el Experimento 2 medidas como absorbancia a 280 nm se enumeran en la **Tabla 1**, junto con los resultados de la cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). El procedimiento SEC indica si la ultrafiltración provocó la formación de especies de alto peso molecular (HMW) o de bajo peso molecular (LMW). La generación de agregados de HMW y/o LMW se considera un indicador de daño a las proteínas. El análisis por medio de HPLC-SEC se llevó a cabo con la muestra diluida a 1 mg/ml antes de la carga sobre la columna de HPLC.

Tabla 1

	Concentración (g/L)	% de HMW	% de LMW	pH
Carga 1	148	3,0	1,1	6,2
Experimento 1	326	3,0	1,1	6,3
Carga 2	148	3,2	3,6	N/R
Experimento 2	319	5,3	3,6	6,4

5 Los resultados de HPLC-SEC no cambiaron entre la Carga 1 y el Experimento 1, lo que indica la operación no afectó a las características de las proteínas. En el Experimento 2, hubo un pequeño incremento en los agregados de alto peso molecular; esto indica que hubo algún daño a las proteínas. Sin embargo, la cantidad de daño a las proteínas se considera pequeño, porque la diferencia en % de HMW entre la Carga 2 y el Experimento 2 fue sólo de aproximadamente 2,1%.

10 Ejemplo 2

El objetivo de los experimentos era concentrar mAb1 por el uso de una técnica de evaporación por membrana en un dispositivo de ultrafiltración que comprende una célula agitada. Una célula agitada hecha por Millipore (Amicon 8010, Billerica, MA) con una membrana de ultrafiltración de 30 kDa se usó en una manera consistente con la UF tradicional, con la excepción del uso de la nueva técnica de concentración por evaporación de la presente invención.

15 El material mAb1 se obtuvo del conjunto de ultrafiltración convencional que resulta de un proceso de purificación completa. En este proceso de purificación completa se usaron una columna de cromatografía de proteína A, una columna de cromatografía de intercambio aniónico, un filtro de retención de virus (por ej., un filtro Planova 20 (Asahi Kasei Corporation, Tokio, Japón)), y un ultrafiltro. La proteína estaba en 171 g/L en 6 mM de histidina, 8 mM de metionina, un tampón a un pH de 6,0. Este material se usó como la carga de partida para los experimentos.

20 El material de carga se procesó por el uso de una membrana de celulosa regenerada de 30 kDa (Millipore PLCTK). Los nuevos filtros se enjuagaron con agua antes de su uso para eliminar la solución de almacenamiento. El sistema se agitó a 80 rpm con un agitador de potencia (Glas-Col 099DGT31, Terre Haute, IN) y un impulsor a través de una abertura en la parte superior. Cuando no estaba en uso, el sistema estaba completamente sellado.

25 Durante el procedimiento de evaporación por membrana, se sopló aire doméstico (ambiente) a través de orificios en la placa base de la célula agitada en el lado de permeación de la membrana a 82737,1 Pa.

Tabla 2

	Concentración (g/L)	% de HMW	% de LMW
Carga	171	2,7	0,3
Conjunto	461	2,6	0,3

30 Por el uso del dispositivo de evaporación por membrana de célula agitada, la concentración final de proteína excedió la concentración máxima de proteína alcanzable con la ultrafiltración convencional, incluso con una viscosidad de la solución incrementada de manera significativa (FIG. 3; Célula Agitada). Las concentraciones finales medidas como absorbancia a 280 nm se enumeran en la Tabla 2, junto con los resultados de la SEC. El análisis por medio de HPLC-SEC se llevó a cabo con la muestra diluida a 1 mg/ml antes de la carga sobre la columna de HPLC. Los resultados de HPLC-SEC indicaron que la operación no afectó a las características de las proteínas.

Ejemplo Comparativo 3

35 El objetivo de los experimentos era concentrar mAb1 por el uso de una técnica de evaporación por membrana con un dispositivo de ultrafiltración que comprende una membrana hidrófoba. La FIG. 4 muestra una comparación esquemática entre la técnica de evaporación por membrana de ultrafiltración (hidrófila) usada en el Ejemplo 1 (FIG. 4A) y la técnica de evaporación por membrana hidrófoba usada en este ejemplo (FIG. 4B). La fase gaseosa estaba presente sólo dentro de los poros de la membrana hidrófoba durante la operación. El flujo de aire se aplicó en el lado

de permeación del dispositivo. En esta configuración, el disolvente se evaporó en el aire en los poros de la membrana y se eliminó poco a poco por el aire que fluía en el lado de permeación. La eliminación gradual del disolvente concentró la solución de proteínas. La proteína estaba en contacto con la interfase aire-líquido en el lado de retención de la membrana, lo que creó el potencial para algún daño a las proteínas. Se usó una célula agitada hecha por Millipore (Amicon 8010, Billerica, MA) con una membrana microporosa hidrófoba Durapore PVDF.

Al igual que con anterioridad, el material mAb1 se obtuvo del conjunto de ultrafiltración convencional que resulta de un proceso de purificación completa. La proteína estaba en 171 g/L en 6 mM de histidina, 8 mM de metionina, un tampón a un pH de 6,0. Este material se usó como la carga de partida para los experimentos.

El material de carga se procesó por el uso de una pieza circular de 26 mm (de diámetro) de membrana microporosa hidrófoba de Durapore PVDF (Millipore GVHP04700 (lote R5BN49933)). La membrana se instaló, se humedeció con 70% de etanol, y se purgó con tampón antes de su uso. El sistema se agitó a 38 rpm con un agitador de potencia (Glas-Col 099DGT31) y un impulsor a través de una abertura en la parte superior. Cuando no estaba en uso, el sistema estaba completamente sellado.

Durante el procedimiento de evaporación por membrana, se sopló aire doméstico (ambiente) a través de orificios en la placa base de la célula agitada en el lado de permeación de la membrana a 6894,76 Pa.

Las concentraciones finales medidas como absorbancia a 280 nm se enumeran en la Tabla 3 junto con los resultados de la SEC. El análisis por HPLC-SEC se llevó a cabo con la muestra diluida a 1 mg/ml antes de la carga sobre la columna de HPLC.

Tabla 3

	Concentración (g/L)	% de HMW	% de LMW
Carga	171	3,8	0,2
Conjunto	387	3,5	0,1

Los resultados de HPLC-SEC indicaron que la presencia de la interfase aire-líquido en la técnica de evaporación por membrana microporosa hidrófoba no afectó a las características de las proteínas.

Ejemplo 4

El objetivo de los experimentos era concentrar una proteína de fusión de Fc (Fc1) por el uso de una técnica de evaporación por membrana en un dispositivo de ultrafiltración que comprende una célula agitada. Una célula agitada hecha por Millipore (Amicon 8010, Billerica, MA) con una membrana de ultrafiltración de 30 kDa se usó en una manera consistente con la UF tradicional, con la excepción del uso de la nueva técnica de concentración por evaporación de la presente invención.

El material se obtuvo a partir del conjunto de ultrafiltración convencional que resulta de un proceso de purificación completa. El material de carga se procesó por el uso de una membrana de celulosa regenerada de 30 kDa (Millipore PLCTK). Los nuevos filtros se enjuagaron con agua antes de su uso para eliminar la solución de almacenamiento. El sistema se agitó a 80 rpm con un agitador de potencia (Glas-Col 099DGT31) y un impulsor a través de una abertura en la parte superior. Cuando no estaba en uso, el sistema estaba completamente sellado.

Durante el procedimiento de evaporación por membrana, se sopló aire doméstico (ambiente) a través de orificios en la placa base de la célula agitada en el lado de permeación de la membrana a 82737,1 Pa.

Por el uso del dispositivo de evaporación por membrana de célula agitada, la concentración final de proteína excedió la concentración máxima de proteína alcanzable con la ultrafiltración convencional, incluso con una viscosidad de la solución incrementada de manera significativa (**FIG. 5**). Las concentraciones finales medidas como absorbancia a 280 nm se enumeran en la **Tabla 4**, junto con los resultados de la SEC. El análisis por HPLC-SEC se llevó a cabo con la muestra diluida a 1 mg/ml antes de la carga sobre la columna de HPLC.

Tabla 4

	Concentración (g/L)	% de HMW
Carga	90	2,6
Conjunto	375	4,6

Los resultados de HPLC-SEC indicaron que la operación dio lugar a un pequeño incremento en los niveles de HMW de las proteínas. Sin embargo, la cantidad de daño a las proteínas se considera pequeño, porque la diferencia en % de HMW fue sólo de aproximadamente 2%. Estos experimentos indican que la técnica se puede usar con medicamentos proteicos distintas de anticuerpos.

5 Ejemplo 5

El objetivo de los experimentos era concentrar mAb1 por el uso de una técnica de evaporación por membrana en un dispositivo de ultrafiltración que comprende un módulo de filtración de flujo tangencial (TFF, por su sigla en inglés) a gran escala. TFF (también conocida como filtración de flujo transversal) se puede aplicar a un dispositivo de fibra hueca o un dispositivo de placa y marco. Un módulo TFF hecho por Sartorius AG (Goettingen, Alemania) con una membrana de ultrafiltración de 30 kDa se usó en una manera consistente con la UF tradicional, con la excepción del uso de la nueva técnica de concentración por evaporación de la presente invención.

El material se obtuvo del conjunto de ultrafiltración convencional que resulta de un proceso de purificación completa. Durante el procedimiento de evaporación por membrana, se sopló aire doméstico (ambiente) a través del lado de permeación de la membrana a 82737,1 Pa.

Por el uso del dispositivo de evaporación por membrana de TFF, la concentración final de proteína excedió la concentración máxima de proteína alcanzable con la ultrafiltración convencional, incluso con una viscosidad de la solución incrementada de manera significativa (datos no mostrados). Se recogió el conjunto de UF y se midió la concentración y el volumen del conjunto. El filtro se recirculó luego con tampón de lavado para recuperar el producto adicional y se recogió el tampón de lavado. Este paso de lavado se repitió, y luego se midieron las concentraciones y volúmenes de los dos pasos de lavado. Las concentraciones finales medidas como absorbancia a 280 nm, así como también los volúmenes de las muestras del conjunto y de lavado, se enumeran en la **Tabla 5**, junto con los resultados de la SEC. Se calcularon los volúmenes, las concentraciones, y los rendimientos que se han obtenido del conjunto, el conjunto combinado con el primer lavado, y el conjunto combinado con la primera y la segunda muestras de lavado y se muestran en la **Tabla 5** como los Datos del Conjunto Virtual Calculado. El análisis por HPLC-SEC se llevó a cabo con la muestra diluida a 1 mg/ml antes de la carga sobre la columna de HPLC.

Tabla 5

	Datos de Muestra					Datos del Conjunto Virtual Calculado		
	Concentración [g/L]	% de Rendimiento	Volumen [ml]	% de HMW	% de LMW	% de Rendimiento	Volumen [ml]	Concentración [g/L]
Carga	150	100	2013	0,6	0,5			
Conjunto de UF	415	62	450	0,8	0,4	62	450	415
Lavado 1	328	24	224	0,8	0,4	86	674	386
Lavado 2	154	11	224	0,7	0,5	98	898	328

Los resultados de HPLC-SEC indicaron que la operación no afectó a las características de las proteínas. La recuperación de la mAb1 fue alta y la operación duró menos de tres horas. Esto indica que la técnica de evaporación por membrana se puede llevar a cabo a gran escala, lo que da como resultado una buena calidad del producto y un alto rendimiento.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la generación de una solución de proteínas altamente concentrada en un aparato, que comprende los pasos de:
- (i) cargar una primera solución de proteínas en una solución tampón acuosa en un tanque de retención;
- 5 (ii) permitir que la primera solución de proteínas fluya desde el tanque de retención a un dispositivo de ultrafiltración y
- (a) hacer circular la primera solución de proteínas a través del dispositivo de ultrafiltración, en el que el dispositivo de ultrafiltración comprende una membrana porosa hidrófila con un lado de retención y un lado de permeación, el tamaño de poro de la membrana es tal que se permite que el tampón acuoso se absorba en la membrana mientras que las proteínas son retenidas;
- 10 (b) aplicar un flujo de gas al lado de permeación de la membrana porosa hidrófila, el flujo de gas se aplica a través del lado de permeación de la membrana; y
- (c) recoger una segunda solución de proteínas en el lado de retención, en el que la segunda solución de proteínas es una solución de proteínas altamente concentrada, en la que la solución de proteínas altamente concentrada comprende por lo menos 200 g/L de proteína, preferentemente por lo menos 260 g/L de proteína, por lo menos 350 g/L de proteína o 460 g/L de proteína,
- 15 en el que la aplicación del flujo de gas al lado de permeación de la membrana porosa hidrófila permite que el tampón acuoso de la primera solución de proteínas se absorba en la membrana porosa hidrófila y se evapore fuera de la membrana porosa hidrófila.
- 20 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dispositivo de ultrafiltración es un dispositivo de fibra hueca, un dispositivo de placa y marco, un dispositivo de enrollado en espiral, o un dispositivo de célula agitada.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paso de la circulación de la primera solución de proteínas se repite antes del paso de la recogida de la segunda solución de proteínas.
- 25 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura fuera del aparato es de 2 °C a 60 °C o 20 °C a 45 °C.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la primera solución de proteínas es una solución de anticuerpos o una solución de proteínas terapéuticas.
- 30 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la primera solución de proteínas es una solución de anticuerpos monoclonales.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento resulta en menos de 5% o menos de 2,2% de incremento en la formación de especies de alto peso molecular (HMW) en la solución de proteínas altamente concentrada.
- 35 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento resulta en menos de 5% o menos de 2,2% de incremento en la formación de especies de bajo peso molecular (LMW) en la solución de proteínas altamente concentrada.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento además comprende un primer paso de generación de una solución concentrada de proteínas mediante el uso de un procedimiento de ultrafiltración convencional.
- 40 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la temperatura fuera del aparato es de 2 °C a 60 °C o 20 °C a 5 °C.

FIGURA 1

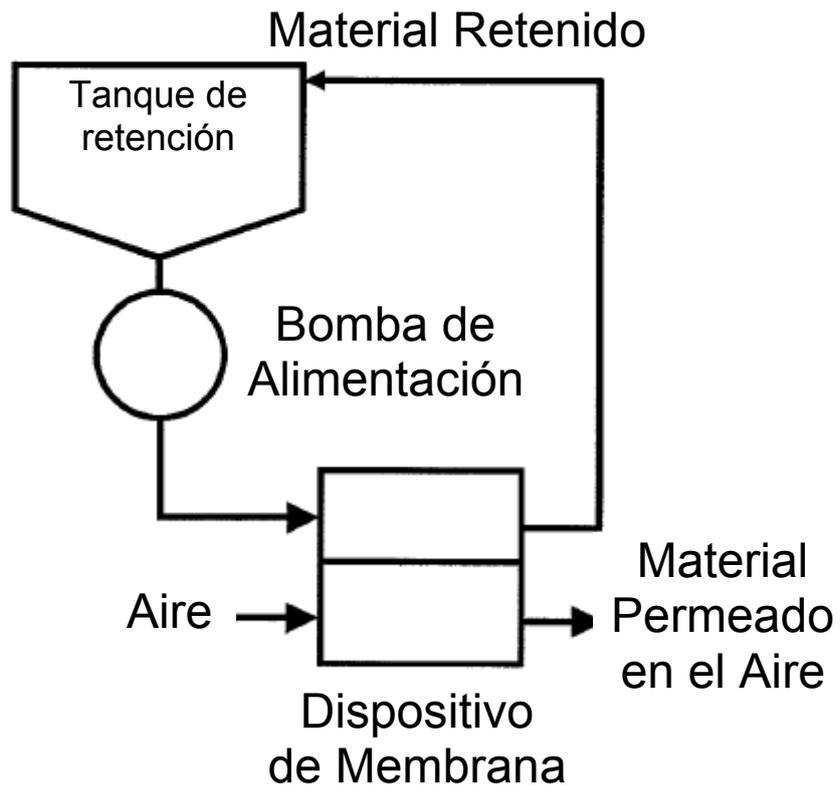


FIGURA 2

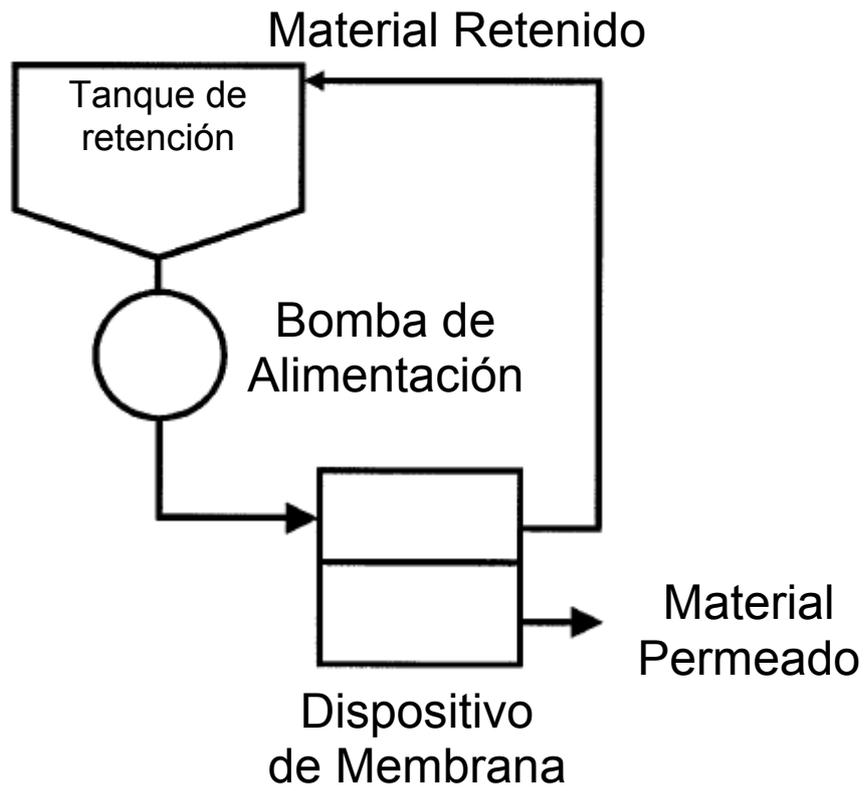


FIGURA 3

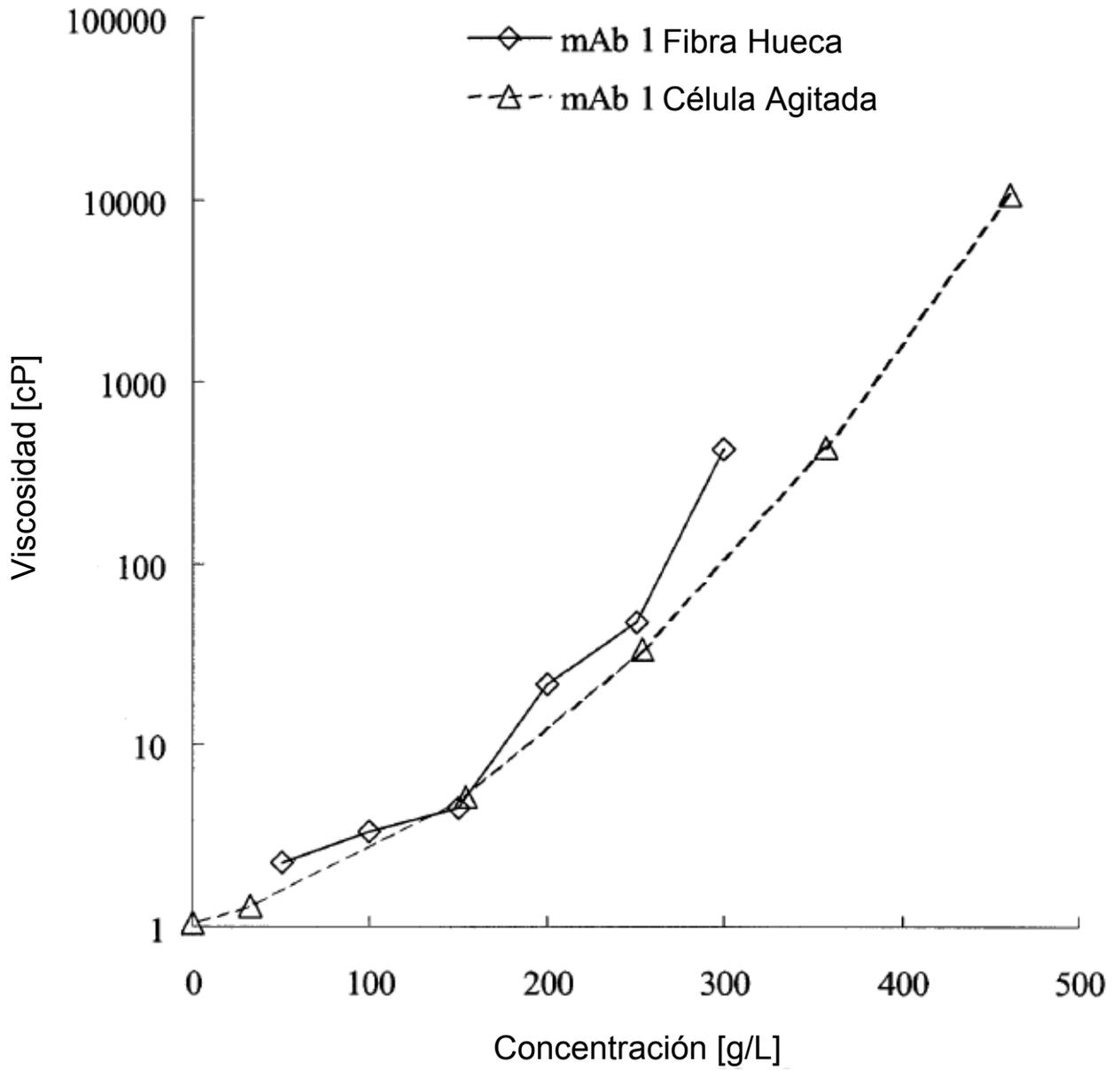


FIGURA 4A
ESQUEMA DE TÉCNICA DE EVAPORACIÓN POR MEMBRANA DE

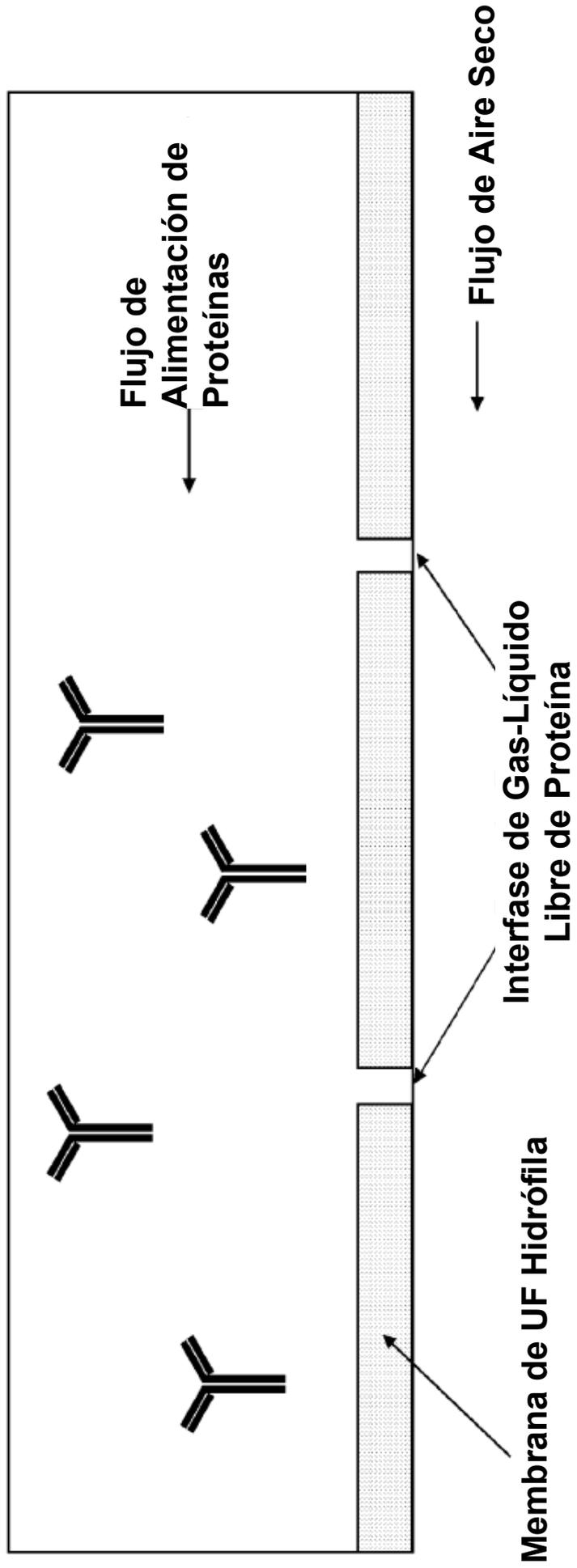


FIGURA 4B

ESQUEMA DE TÉCNICA DE EVAPORACIÓN POR MEMBRANA

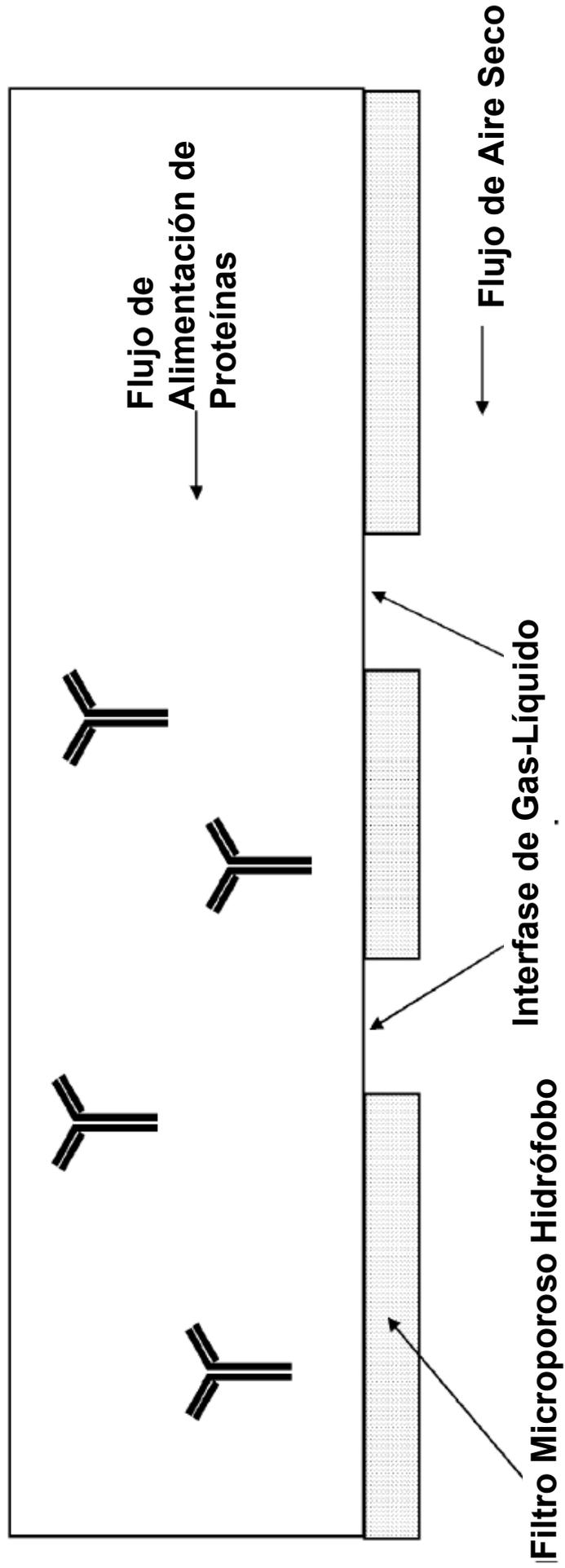


FIGURA 5

