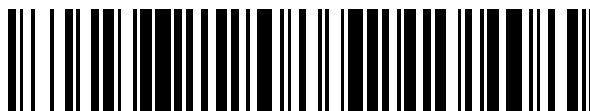


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 403**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2010 E 16188558 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3133083**

54 Título: **Filtración final de múltiples etapas**

30 Prioridad:

01.10.2009 EP 09012460

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

16.10.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FALKENSTEIN, ROBERTO y
SCHWENDNER, KLAUS**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 787 403 T3

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

DESCRIPCIÓN

Filtración final de múltiples etapas

5 En el presente documento se informa de un procedimiento para la filtración final de soluciones de polipéptido concentradas que comprende la combinación de dos etapas de filtración inmediatamente consecutivas con una primera etapa de filtración con una prefiltración con un filtro con un tamaño de poro de 3,0 μm y una filtración principal con un filtro con un tamaño de poro de 0,8 μm y una segunda filtración con una prefiltración con un filtro con un tamaño de poro de 0,45 μm y con una filtración principal con un filtro con un tamaño de poro de 0,22 μm .

10

Antecedentes de la invención

15 Las soluciones de proteína con una concentración de más de 100 g/l son propensas a experimentar dificultades durante la etapa de filtración final, por ejemplo, al tener solo bajos flujos transmembranarios o bloquear el filtro empleado por agregados o partículas formados durante el procedimiento de formulación o concentración o debido a excipientes añadidos, dando como resultado una viscosidad incrementada de la solución concentrada.

20 La combinación de alta viscosidad y contenido incrementado de partículas o agregados a menudo da como resultado el bloqueo de los poros de un filtro de filtración final de 0,22 μm empleado. Como consecuencia, se tiene que reemplazar el filtro durante la etapa de filtración, es decir, antes de que el lote se procese por completo, o bien se tiene que usar una superficie de filtro incrementada.

25 Además, se ha observado que una combinación de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 μm y un filtro con un tamaño de poro de 0,22 μm no tiene ninguna ventaja proporcionada, por ejemplo, como filtro Sartobran P de 0,45/0,22 μm . Se emplean filtros con un tamaño de poro incrementado probablemente para evitar los problemas descritos anteriormente como filtros de profundidad o prefiltros, pero no como filtros finales.

30 En el documento DE 4 204 444 se informa de una combinación de un prefiltro de 1,2 μm para retirar gotículas de agua de una corriente de gas antes de una filtración estéril de 0,2 μm . En el documento US 4.488.961 se informa de una unidad de filtro que comprende dos filtros de diferente tamaño de poro, con lo que el filtro del tamaño de poro más pequeño es flexible, lo que permite, al cambiar el sentido de flujo, que el filtro se doble para reducir la resistencia de la unidad de filtro. En el documento US 5.643.566 se informa de una combinación de una prefiltración con un filtro con un tamaño de poro de 0,45 μm y una filtración estéril con un filtro de un tamaño de poro de 0,22 μm . En el documento EP 0 204 836 se informa de un filtro de dos fases construido usando una membrana con un interior liso reforzada con una membrana delgada, flexible y porosa soportada por un soporte de tamiz rígido con un tubo expansor estriado. En el documento DE 3 818 860 se informa de una combinación de al menos dos unidades de filtro de membrana de diferente material de membrana y diferente tamaño de poro de filtro y geometrías de poro de filtro.

40 Aldington *et al.* (J. Chrom. B 848 (2007) 64-78) informan de un aumento a escala de los procedimientos de purificación de anticuerpos monoclonales. En el documento CS 247484 se informa de un procedimiento de preparación de inmunoglobulina frente a linfocitos humanos.

Sumario de la invención

45 La invención se define por las reivindicaciones.

50 Se ha descubierto que se puede usar una combinación de dos filtros, comprendiendo cada uno un prefiltro y un filtro principal, y cada uno con un tamaño de poro seleccionado específicamente para filtrar soluciones de inmunoglobulina altamente concentradas durante la etapa de envasado final sin el riesgo de bloqueo de los poros y la necesidad de reemplazar el filtro durante el procedimiento de filtración.

En el presente documento se divulga un procedimiento para la preparación de una solución de inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas

55 a) proporcionar una solución de inmunoglobulina con una concentración de proteína de al menos 100 g/l,

60 b) filtrar la solución de inmunoglobulina a través de una combinación de un primer y segundo filtro, con lo que el primer filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 3,0 μm y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,8 μm y el segundo filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 0,45 μm y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,22 μm , y preparar, de este modo, una solución de inmunoglobulina.

65 En el presente documento se divulga el uso de una combinación de filtros como se informa en el presente documento de una combinación de un primer y segundo filtro, con lo que el primer filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 3,0 μm y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,8 μm y el segundo filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 0,45 μm y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,22 μm , para la filtración final de una solución de inmunoglobulina antes de la preparación del ingrediente farmacéutico activo.

Un aspecto de la invención es un procedimiento para producir un anticuerpo anti-HER2, que comprende las siguientes etapas

- 5 a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-HER2,
- b) recuperar el anticuerpo anti-HER2 de la célula o del medio de cultivo,
- 10 c) purificar el anticuerpo anti-HER2 con una o más etapas de cromatografía y proporcionar una solución de anticuerpo anti-HER2,
- d) añadir un glúcido y un detergente a la solución,
- 15 e) concentrar la solución de anticuerpo anti-HER2 a una concentración de 125 g/l o más con un procedimiento seleccionado de diafiltración o filtración de flujo tangencial, y
- 20 f) aplicar la solución de anticuerpo anti-HER2 de la etapa previa a una combinación de una primera y segunda unidad de filtro, con lo que la primera unidad de filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 3,0 μm y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,8 μm y la segunda unidad de filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 0,45 μm y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,22 μm con una presión de 0,75 bar (75 kPa) o menos, y producir, de este modo, un anticuerpo anti-HER2.

25 En el presente documento se divulga un kit que comprende un primer filtro que comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 3,0 μm y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,8 μm y el segundo filtro que comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 0,45 μm y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,22 μm .

30 En un modo de realización, el primer filtro tiene un área que es como máximo el doble del área del segundo filtro. En otro modo de realización, el primer y segundo filtro tienen aproximadamente la misma área de filtro total. En otro modo de realización, la solución de inmunoglobulina tiene una concentración de desde 100 g/l a 300 g/l. Todavía en otro modo de realización, la solución de inmunoglobulina tiene un volumen de desde 3 litros a 100 litros. En otro modo de realización, la solución de inmunoglobulina comprende un glúcido y un tensioactivo y tiene una concentración de 125 mg/ml o más y la filtración es con una presión aplicada de 0,7 bar (70 kPa) o menos.

35 En otro modo de realización, la purificación es con una etapa de cromatografía de afinidad con proteína A y al menos una etapa seleccionada de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrófoba.

Descripción detallada de la invención

40 Se ha descubierto que se puede usar una combinación de dos filtros o unidades de filtro, comprendiendo cada uno un prefiltro y un filtro principal, y cada uno con un tamaño de poro seleccionado específicamente para filtrar soluciones de inmunoglobulina altamente concentradas y viscosas, así como formuladas, es decir, que comprendan un glúcido y un tensioactivo, durante la etapa de envasado final. Especialmente, la combinación de un primer filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 3,0 μm y 0,8 μm , respectivamente, y un segundo filtro que
45 comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,45 μm y 0,22 μm , respectivamente, es altamente ventajosa. Con una única unidad de filtro de esta combinación, ha sido posible filtrar soluciones altamente concentradas que contenían en total, por ejemplo, 1 kg de un anticuerpo anti-IL-13Ra1 o 6 kg de un anticuerpo anti-HER2, y envasar estas cantidades solo con escasas pérdidas de sustancia. En un modo de realización, se ha
50 determinado una proporción del área superficial de filtro con respecto al volumen de la solución.

55 La solución de inmunoglobulina comprende la inmunoglobulina y un excipiente. En un modo de realización, el excipiente comprende una o más sustancias seleccionadas de glúcidos, tales como glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa y rafinosa, aminoácidos, tales como arginina, lisina, histidina, ornitina, isoleucina, leucina, alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, glicina y metionina, sales, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, citrato de sodio, citrato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio y un tensioactivo, tal como polisorbatos, y polímeros de polioxi-etileno-polioxi-propileno.

60 La filtración como se informa en el presente documento se usa como la etapa de filtración final en la producción de un anticuerpo terapéutico. Se puede llevar a cabo después de que se hayan añadido los excipientes, estabilizador y/o antioxidantes requeridos a la solución de anticuerpo altamente concentrada. En un modo de realización, la proporción de la cantidad de anticuerpo en kg con respecto al área total del filtro es de desde 1000 g/m² a 10.000 g/m². En otro modo de realización, la proporción es de desde 1000 g/m² a 6000 g/m². Todavía en otro modo de realización, la proporción es de 4000 g/m² a 6000 g/m².

65 Un "polipéptido" es un polímero que consiste en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, bien producido de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácido se pueden denominar

- "péptidos", mientras que las moléculas que consisten en dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos de aminoácido se pueden denominar "proteínas". Un polipéptido también puede comprender componentes distintos de aminoácido, tales como grupos carbohidratados, iones de metal o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes distintos de aminoácido se pueden añadir por la célula, en la que se expresa el polipéptido, y pueden variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en términos de su estructura de la cadena principal de aminoácido o del ácido nucleico que codifica los mismos. Las adiciones, tales como grupos carbohidratados, en general, no se especifican, pero, no obstante, pueden estar presentes.
- El término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los diferentes genes de la región constante, así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en una variedad de formatos, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂, así como únicas cadenas (scFv) o diacuerpos.
- El término "inmunoglobulina completa" indica una inmunoglobulina que comprende los dos llamados polipéptidos de la cadena de inmunoglobulina ligera (cadena ligera) y los dos llamados polipéptidos de la cadena de inmunoglobulina pesada (cadena pesada). Cada uno de los polipéptidos de la cadena de inmunoglobulina pesada y ligera de una inmunoglobulina completa contiene un dominio variable (región variable) (en general, la porción aminoterminal de la cadena polipeptídica) que comprende regiones de unión que pueden interactuar con un antígeno. Cada uno de los polipéptidos de la cadena de inmunoglobulina pesada y ligera de una inmunoglobulina completa también comprende una región constante (en general, la porción carboxiterminal). La región constante de la cadena pesada media en la unión del anticuerpo i) a las células que tienen un receptor Fc gamma (FcγR), tal como las células fagocíticas, o ii) a las células que tienen el receptor Fc neonatal (FcRn), también conocido como el receptor Brambell. También media en la unión a algunos factores, incluyendo los factores del sistema del complemento clásico, tales como el componente (C1q). El dominio variable de la cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina comprende, a su vez, diferentes segmentos, es decir, cuatro regiones estructurales (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).
- El término "fragmento de inmunoglobulina" indica un polipéptido que comprende al menos un dominio del dominio variable de una cadena pesada, el dominio C_{H1}, la región bisagra, el dominio C_{H2}, el dominio C_{H3}, el dominio C_{H4} de una cadena pesada, el dominio variable de una cadena ligera y/o el dominio C_L de una cadena ligera. También están comprendidos derivados y variantes del mismo. Por ejemplo, puede estar presente un dominio variable, en el que se delecionan uno o más aminoácidos o regiones de aminoácido.
- El término "conjugado de inmunoglobulina" indica un polipéptido que comprende al menos un dominio de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina conjugada por medio de un enlace peptídico a otro polipéptido. El otro polipéptido es un péptido distinto de inmunoglobulina, tal como una hormona, o receptor de crecimiento, o péptido antifusógeno, o factor del complemento, o similares.
- El término "filtro" indica tanto un filtro microporoso como macroporoso. El filtro comprende una membrana de filtro que por sí misma está compuesta por un material polimérico, tal como, por ejemplo, polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, politetrafluoroetileno, policarbonato, poli(cloruro de vinilo), poliamidas (nailon, por ejemplo, Zetapore™, N₆₆ Posidyne™), poliésteres, acetato de celulosa, celulosa regenerada, materiales compuestos de celulosa, polisulfonas, polietersulfonas, poliarilsulfonas, polifenilsulfonas, poliacrilonitrilo, poli(fluoruro de vinilideno), telas no tejidas y tejidas (por ejemplo, Tyvek®), material fibroso o de material inorgánico, tal como zeolita, SiO₂, Al₂O₃, TiO₂ o hidroxiapatita. En un modo de realización, la membrana de filtro del primer y segundo filtro está fabricada de acetato de celulosa.
- Para la purificación de inmunoglobulinas producidas de forma recombinante, a menudo se emplea una combinación de diferentes etapas de cromatografía en columna. En general, una cromatografía de afinidad con proteína A está seguida de una o dos etapas de separación adicionales. La etapa de purificación final es la llamada "etapa de pulido" para la retirada de microimpurezas y oligocontaminantes, como inmunoglobulinas agregadas, HCP (proteína de la célula huésped) residual, ADN (ácido nucleico de la célula huésped), virus o endotoxinas. Para esta etapa de pulido, a menudo se usa un material de intercambio aniónico en un modo de fracción no adsorbida.
- Diferentes procedimientos están bien establecidos y se usan ampliamente para la recuperación y purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio en modo mixto), adsorción tiófila (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o de adsorción aromática (por ejemplo, con Phenyl-Sepharose, resinas aza-arenófilas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad con quelatos de metal (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M. A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).
- En un modo de realización, la solución de inmunoglobulina tiene un volumen de desde 3 litros a 100 litros. Este volumen de solución es equivalente a una masa total de la inmunoglobulina de desde 300 g a 50.000 g. En un modo de

realización, el volumen es de desde 3,1 litros a 80 litros. A una concentración de proteína de desde 120 g/l a 165 g/l, este volumen de solución es equivalente a una masa total de la inmunoglobulina de desde 370 g a 13.200 g.

Un aspecto de la invención es un procedimiento para producir un anticuerpo anti-HER2, que comprende las siguientes etapas

a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-HER2,

b) recuperar el anticuerpo anti-HER2 de la célula o del medio de cultivo,

c) purificar el anticuerpo anti-HER2 con una o más etapas de cromatografía y proporcionar una solución de anticuerpo anti-HER2,

d) añadir un glúcido y un detergente a la solución,

e) concentrar la solución de anticuerpo anti-HER2 a una concentración de 125 g/l o más con un procedimiento seleccionado de diafiltración o filtración de flujo tangencial, y

f) aplicar la solución de anticuerpo anti-HER2 de la etapa previa a una combinación de una primera y segunda unidad de filtro, con lo que la primera unidad de filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 3,0 μm y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,8 μm y la segunda unidad de filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 0,45 μm y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,22 μm con una presión de 0,75 bar (75 kPa) o menos, y producir, de este modo, un anticuerpo anti-HER2.

En un modo de realización, la célula es una célula procariota o una célula eucariota. En un modo de realización en el que la célula es una célula procariota, la célula se selecciona de células de *E. coli* o células de bacilo. En un modo de realización en el que la célula es una célula eucariota, la célula se selecciona de células de mamífero, en un modo de realización especial de células CHO, células BHK, células HEK, células PER.C6[®] y células de hibridoma. En un modo de realización, la célula es una célula de mamífero seleccionada de CHO-K1 y CHO DG44. En un modo de realización, el cultivo está a una temperatura de desde 20 °C a 40 °C, y durante un periodo de desde 4 a 28 días. En un modo de realización, la purificación es con una etapa de cromatografía de afinidad con proteína A y al menos una etapa seleccionada de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrófoba.

Se ha descubierto que una combinación de una primera unidad de filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 3,0 μm y 0,8 μm , respectivamente, y una segunda unidad de filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,45 μm y 0,22 μm , respectivamente, es ventajosa para procesar (filtrar) una solución de inmunoglobulina altamente concentrada al permitir la filtración de un lote completo de una solución de inmunoglobulina concentrada sin la necesidad de reemplazar el filtro.

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

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

Si la solución es una solución de inmunoglobulina concentrada con una concentración de 160 g/l o más, es decir, 165 g/l o 170 g/l, a la que no se le ha añadido ningún glúcido o tensioactivo, entonces el procedimiento se ejecuta con una presión aplicada de 1,45 bar (145 kPa) o más, en otro de 1,5 bar (150 kPa) o más. Si la solución es una solución de inmunoglobulina concentrada con una concentración de 125 g/l o más, es decir, 130 g/l o 135 g/l, a la que se le han añadido al menos un glúcido y un tensioactivo, entonces el procedimiento se ejecuta en un modo de realización con una presión aplicada de 0,7 bar (70 kPa) o menos.

En el presente documento se divulga un kit que comprende una primera unidad de filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 3,0 μm y 0,8 μm , respectivamente, y una segunda unidad de filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,45 μm y 0,22 μm , respectivamente. En el presente documento se divulga el uso de un filtro que comprende una primera unidad de filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 3,0 μm y 0,8 μm , respectivamente, y una segunda unidad de filtro que comprende un prefiltro y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,45 μm y 0,22 μm , respectivamente, para la filtración de una solución de inmunoglobulina concentrada con una concentración de proteína de al menos 100 g/l.

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar al entendimiento de la presente invención, exponiéndose su verdadero alcance en las reivindicaciones adjuntas.

Figuras

- 5 **Figura 1:** Evolución temporal del flujo de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 222 mg/ml y una presión aplicada de 2,0 bar (200 kPa) (rombos = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 1,2 µm; cuadrados = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 3,0 µm).
- 10 **Figura 2:** Evolución temporal del flujo de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 125 mg/ml complementada con trehalosa aproximadamente 200 mM y Tween 20 aproximadamente al 0,05 % (p/v) y una presión aplicada de 2,0 bar (200 kPa) (rombos = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 1,2 µm; cuadrados = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 3,0 µm).
- 15 **Figura 3:** Evolución temporal del flujo de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 162 mg/ml y una presión aplicada de 1,8 bar (180 kPa) (rombos = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 1,2 µm; cuadrados = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 3,0 µm).
- 20 **Figura 4:** Evolución temporal del flujo de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-IL13Rα con una concentración de anticuerpo de 141 mg/ml complementada con trehalosa aproximadamente 200 mM y poloxámero aproximadamente al 0,2 % (p/v) y una presión aplicada de 1,6 bar (160 kPa) (rombos = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 1,2 µm; cuadrados = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 3,0 µm).
- 25 **Figura 5:** Evolución temporal del flujo de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 162 mg/ml y una presión aplicada de 1,1 bar (110 kPa) (rombos = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 1,2 µm; cuadrados = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 3,0 µm).
- 30 **Figura 6:** Evolución temporal del flujo de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-IL13Rα con una concentración de anticuerpo de 141 mg/ml complementada con trehalosa y poloxámero y una presión aplicada de 0,8 bar (80 kPa) (rombos = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 1,2 µm; cuadrados = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 3,0 µm).
- 35 **Figura 7:** Evolución temporal del flujo de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 125 mg/ml complementada con trehalosa y Tween 20 y una presión aplicada de 0,8 bar (80 kPa) (rombos = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 1,2 µm; cuadrados = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 3,0 µm).
- 40 **Figura 8:** Evolución temporal del flujo de permeado obtenido con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 125 mg/ml complementada con trehalosa y Tween 20 y una presión aplicada de 0,3 bar (30 kPa) (rombos = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 1,2 µm; cuadrados = combinación que contiene filtro de tamaño de poro de 3,0 µm).

45 **Ejemplo 1**

Material y procedimientos

Anticuerpo

50 Un anticuerpo ejemplar es una inmunoglobulina frente a la proteína α1 del receptor para IL13 (anticuerpo anti-IL13Rα1), por ejemplo, como se informa en la SEQ ID NO: de 01 a 12 del documento WO 2006/072564.

Otra inmunoglobulina ejemplar es un anticuerpo anti-HER2 sobre el que se informa en los documentos WO 92/022653, WO 99/057134, WO 97/04801, US 5.677.171 y US 5.821.337.

55 Filtro

En el presente documento, entre otros, se han empleado de forma ejemplar un cartucho de filtro Sartobran P de 0,45 µm + 0,2 µm y un cartucho de filtro Sartoclean CA de 3,0 µm + 0,8 µm.

60 Ambos cartuchos de filtro están disponibles de Sartorius AG, Gotinga, Alemania.

Procedimientos analíticos

Cromatografía de exclusión por tamaño:

resina:	TSK 3000 (Tosohaas)
columna:	300 x 7,8 mm
caudal:	0,5 ml/min
tampón:	fosfato de potasio 200 mM, que contiene cloruro de potasio 250 mM, ajustado a pH 7,0
longitud de onda:	280 nm
sistema umbral de ADN:	véase, por ejemplo, Merrick, H., y Hawlitschek, G., Biotech Forum Europe 9 (1992) 398-403

5 ELISA para proteína A: Los pocillos de una placa de microvaloración se recubren con una IgG anti-proteína A policlonal derivada de pollo. Después de su unión, se retira el anticuerpo sin reaccionar por lavado con tampón de muestra. Para la unión de la proteína A, se añade un volumen de muestra definido a los pocillos. La proteína A presente en la muestra se une por el anticuerpo de pollo y se retiene en los pocillos de la placa. Después de la incubación, se retira la solución de muestra y se lavan los pocillos. Para la detección se añaden posteriormente un conjugado IgG anti-proteína A policlonal derivada de pollo-biotina y un conjugado estreptavidina-peroxidasa. Después de otra etapa de lavado, se añade solución de sustrato, dando como resultado la formación de un producto de reacción coloreado. La intensidad del color es proporcional al contenido de proteína A de la muestra. Después de un tiempo definido, se detiene la reacción y se mide la absorbancia.

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

20 **Ejemplo 2**

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

25 En este ejemplo, se muestra que una solución de inmunoglobulina altamente concentrada no se puede filtrar con un único filtro estéril con un tamaño de poro de 0,45 µm (prefiltro) y 0,22 µm (filtro principal) sin el bloqueo de los poros del filtro con una carga de más de 2460 g de proteína por metro cuadrado de área de filtro.

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

Tabla 1: Soluciones empleadas en la filtración con único filtro.

solución n.º	1	2	3	4	5
masa de proteína [g]	473	491	496	501	542
volumen [l]	3,940	4,200	4,134	4,139	4,516
carga [g/m ²]	2365	2455	2480	2505	2710

35 Las soluciones de inmunoglobulina concentradas se filtraron a través del único filtro con los parámetros como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Parámetros del procedimiento.

solución n.º	1	2	3	4	5
flujo volumétrico [l/h]	1,97	2,1	Descenso a 0 debido al bloqueo de los poros	Descenso a 0 debido al bloqueo de los poros	Descenso a 0 debido al bloqueo de los poros

flujo másico [g/h]	237	246	Descenso a 0 debido al bloqueo de los poros	Descenso a 0 debido al bloqueo de los poros	Descenso a 0 debido al bloqueo de los poros
--------------------	-----	-----	---	---	---

Para las soluciones n.º de 3 a 5, se bloquearon los poros del único filtro antes de la filtración completa del volumen del lote. Para completar la filtración, se tuvo que cambiar el filtro bloqueado, dando como resultado un tiempo adicional requerido y pérdida de producto.

5

Tabla 3: Resultados de la filtración.

solución n.º	1	2	3	4	5
masa de proteína que atraviesa el filtro [g/m ²]	2365	2455	960	968	1440
volumen que atraviesa el filtro [l]	3,940	4,200	1,600	1,600	2,400
bloqueo de los poros del filtro	NO	NO	SÍ	SÍ	SÍ

Ejemplo 3

10

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

15

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

20

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

Tabla 4: Soluciones empleadas en la filtración con filtros combinados.

solución n.º	6	7	8	9	10
masa de proteína [g]	5217	5191	5356	6151	5580
volumen [l]	42,070	42,201	43,542	48,055	44,998
carga [g/m ²]	4347,5	4325,8	4463,3	5125,8	4650,0

25

Las soluciones de inmunoglobulina concentradas se filtraron a través de la combinación de los dos filtros con los parámetros como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: Parámetros del procedimiento.

30

solución n.º	6	7	8	9	10
flujo volumétrico [l/h]	38,95	42,20	43,54	33,02	45,00
flujo másico [g/h]	4830	5191	5356	4226	5580

Para ninguna de las soluciones n.º de 6 a 10, se bloquearon los poros de los filtros combinados antes de la filtración completa del volumen del lote.

35

Tabla 6: Resultados de la filtración.

solución n.º	6	7	8	9	10
masa de proteína que atraviesa el filtro [g/m ²]	4347,5	4325,8	4463,3	5125,8	4650,0
volumen que atraviesa el filtro [l]	42,070	42,201	43,542	48,055	44,998
bloqueo de los poros del filtro	NO	NO	NO	NO	NO

Ejemplo 4

5 **Filtración de un anticuerpo anti-IL13R α con una combinación de filtros de un filtro con tamaño de poro de 3,0 μ m y 0,8 μ m y un filtro con tamaño de poro de 0,45 μ m y 0,22 μ m y ambos filtros con diferentes áreas de filtro**

En este ejemplo, se muestra que un eluato de proteína A acondicionado se puede filtrar con una combinación de dos filtros, pero se tiene que reducir el flujo si el área de filtro no se iguala entre los dos filtros.

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

15 **Tabla 7:** Soluciones empleadas en la filtración con filtros combinados.

solución n.º	11	12	13	14	15
masa de proteína [g]	1169,0	1299,6	1154,4	1220,4	1284,7
volumen [l]	71,4	76,0	74,0	67,8	70,2
carga [g/m ²]	487,1	541,5	481,0	508,5	535,3

Las soluciones de inmunoglobulina concentradas se filtraron a través del filtro combinado con los parámetros como se muestra en la tabla 8.

20 **Tabla 8:** Parámetros del procedimiento.

solución n.º	11	12	13	14	15
flujo volumétrico [l/h]	Descenso a 0 debido al bloqueo de los poros	22	13	12	98
flujo másico [g/h]	Descenso a 0 debido al bloqueo de los poros	376	203	216	1793

25 Para la solución n.º 11, se bloquearon los poros del filtro combinado antes de la filtración completa del volumen del lote. Para completar la filtración, se tuvo que cambiar el filtro bloqueado, dando como resultado un tiempo adicional requerido y pérdida de producto.

Tabla 9: Resultados de la filtración.

solución n.º	1	2	3	4	5
masa de proteína que atraviesa el filtro [g/m ²]	347,9	541,5	481,0	508,5	535,3
volumen que atraviesa el filtro [l]	51,0	76,0	74,0	67,8	70,2
bloqueo de los poros del filtro	SÍ	NO	NO	NO	NO

30

Para prevenir el bloqueo del filtro como en el experimento con la solución n.º 11, se tuvo que reducir el flujo a través de la membrana en los experimentos con las soluciones n.º de 12 a 14. En el experimento con la solución n.º 15, se decantó el eluato de proteína A, dando como resultado una pérdida de proteína.

5 **Ejemplo 5**

Filtración de un anticuerpo anti-IL13R α con una combinación de filtros de un filtro con tamaño de poro de 3,0 μm y 0,8 μm y un filtro con tamaño de poro de 0,45 μm y 0,22 μm y cada uno de ambos filtros con la misma área de filtro

10 En este ejemplo, se muestra que un eluato de proteína A acondicionado se puede filtrar con una combinación de dos filtros sin una reducción del flujo si el área de filtro se iguala entre los dos filtros.

15 En este ejemplo, la unidad de filtro con un tamaño de poro de 3,0 μm y 0,8 μm tiene un área de filtro de 0,2 metros cuadrados y la unidad de filtro con un tamaño de poro de 0,45 μm y 0,22 μm tiene un área de filtro de 0,2 metros cuadrados.

Tabla 10: Soluciones empleadas en la filtración con filtros combinados.

solución n.º	16	17	18	19	20
masa de proteína [g]	495	634	825	861	956
volumen [l]	3,5	4,14	5,5	5,6	6,3
carga [g/m ²]	1237,5	1585,0	2062,5	2152,5	2390

20 Para ninguna de las soluciones n.º de 16 a 20, se bloquearon los poros de los filtros combinados antes de la filtración completa del volumen del lote.

Tabla 11: Resultados de la filtración.

solución n.º	16	17	18	19	20
Masa de proteína que atraviesa el filtro [g/m ²]	1237,5	1585,0	2062,5	2152,5	2390
Volumen que atraviesa el filtro [l]	3,5	4,14	5,5	5,6	6,3
Bloqueo de los poros del filtro	NO	NO	NO	NO	NO

Ejemplo 6

30 **Filtración de diferentes soluciones de anticuerpo con diferentes combinaciones de filtros con diferentes concentraciones de proteína, diferentes compuestos en solución y diferentes presiones aplicadas**

35 Las soluciones que comprendían un anticuerpo anti-IL13R α o bien un anticuerpo anti-HER2 se filtraron con una combinación de filtros que empleaba diferente área de filtro y tamaño de poro de filtro, así como diferentes excipientes y presión aplicada.

Las combinaciones de filtros usadas se enumeran en la tabla 12. En lo que sigue, se usará, por lo tanto, la indicación 'A1', 'A2', 'B1' y 'B2'.

Tabla 12: Combinaciones de filtros

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

ES 2 787 403 T3

B2	3,0 µm/47 mm	0,8 µm/26 mm	0,45 µm/26 mm	0,2 µm/26 mm
----	--------------	--------------	---------------	--------------

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

- 5 **Tabla 13:** Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 222 mg/ml y una presión aplicada de 2,0 bar (200 kPa).

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

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

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

combinación	duración de la filtración [min]	flujo [ml/min]	combinación	duración de la filtración [min]	flujo [ml/min]
	13	8,4		13	5,2
	14	8,1		14	4,8
	15	7,4		15	4,3

Tabla 15: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 162 mg/ml y una presión aplicada de 1,8 bar (180 kPa).

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

5

Tabla 16: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-IL13R α con una concentración de anticuerpo de 141 mg/ml complementada con trehalosa aproximadamente 200 mM y poloxámero aproximadamente al 0,2 % (p/v) y una presión aplicada de 1,6 bar (160 kPa).

combinación	duración de la filtración [min]	flujo [ml/min]	combinación	duración de la filtración [min]	flujo [ml/min]
A2	1	15,6	B2	1	13,2
	2	9,4		2	8,1
	3	7,0		3	5,5
	4	5,5		4	4,1
	5	4,6		5	3,3
	6	3,8		6	2,6
	7	3,3		7	2,3
	8	2,9		8	1,9
	9	2,5		9	1,6

combinación	duración de la filtración [min]	flujo [ml/min]	combinación	duración de la filtración [min]	flujo [ml/min]
	10	2,2		10	1,5
	11	1,5		11	1,2
	12	0,5		12	1,2
	13	0,3		13	1,0
	14	0,3		14	0,9
	15	0,3		15	0,8

Tabla 17: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 162 mg/ml y una presión aplicada de 1,1 bar (110 kPa).

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

5

Tabla 18: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-IL13R α con una concentración de anticuerpo de 141 mg/ml complementada con trehalosa y poloxámero y una presión aplicada de 0,8 bar (80 kPa).

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

combinación	duración de la filtración [min]	flujo [ml/min]	combinación	duración de la filtración [min]	flujo [ml/min]
	8	1,5		8	1,5
	9	1,4		9	1,4
	10	1,2		10	1,2
	11	1,1		11	1,1
	12	1,0		12	1,0
	13	0,9		13	0,8
	14	0,8		14	0,8
	15	0,8		15	0,8

Tabla 19: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 125 mg/ml complementada con trehalosa y Tween 20 y una presión aplicada de 0,8 bar (80 kPa).

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

5

Tabla 20: Resultados obtenidos con una solución de anticuerpo anti-HER2 con una concentración de anticuerpo de 125 mg/ml complementada con trehalosa y Tween 20 y una presión aplicada de 0,3 bar (30 kPa).

combinación	duración de la filtración [min]	flujo [ml/min]	combinación	duración de la filtración [min]	flujo [ml/min]
A1	1	3,9	B1	1	3,7
	2	3,2		2	4,8
	3	3,0		3	4,6
	4	2,7		4	3,8
	5	2,6		5	4,0

ES 2 787 403 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un anticuerpo anti-HER2, que comprende las siguientes etapas
- 5 a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-HER2,
- b) recuperar el anticuerpo anti-HER2 de la célula o del medio de cultivo,
- 10 c) purificar el anticuerpo anti-HER2 con una o más etapas de cromatografía y proporcionar una solución de anticuerpo anti-HER2,
- d) añadir un glúcido y un detergente a la solución,
- 15 e) concentrar la solución de anticuerpo anti-HER2 a una concentración de 125 g/l o más con un procedimiento seleccionado de diafiltración o filtración de flujo tangencial, y
- 20 f) aplicar la solución de anticuerpo anti-HER2 de la etapa previa a una combinación de una primera y segunda unidad de filtro, con lo que la primera unidad de filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 3,0 μm y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,8 μm y la segunda unidad de filtro comprende un prefiltro con un tamaño de poro de 0,45 μm y un filtro principal con un tamaño de poro de 0,22 μm con una presión de 0,75 bar (75 kPa) o menos, y producir, de este modo, un anticuerpo anti-HER2.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la purificación es con una etapa de cromatografía de afinidad con proteína A y al menos una etapa seleccionada de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrófoba.
- 25

Fig. 1

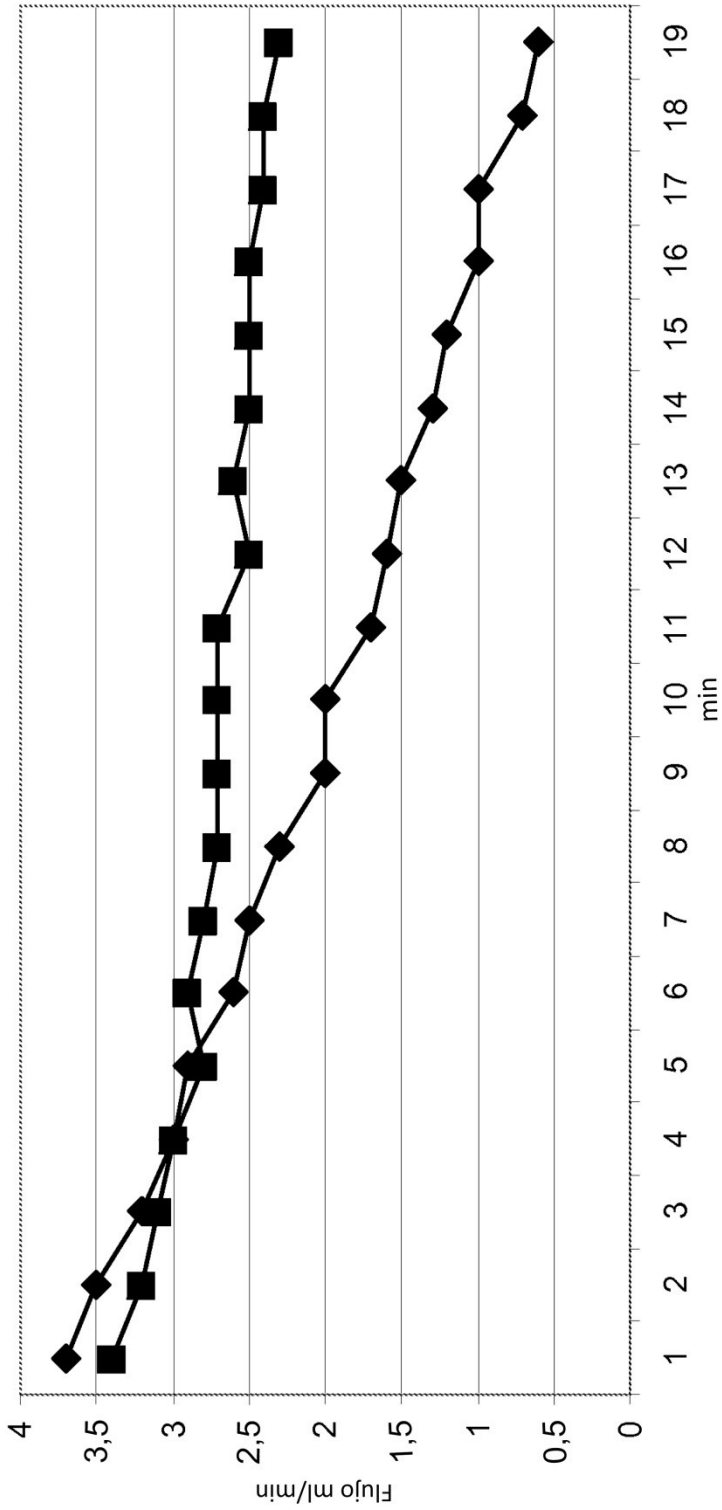


Fig. 2

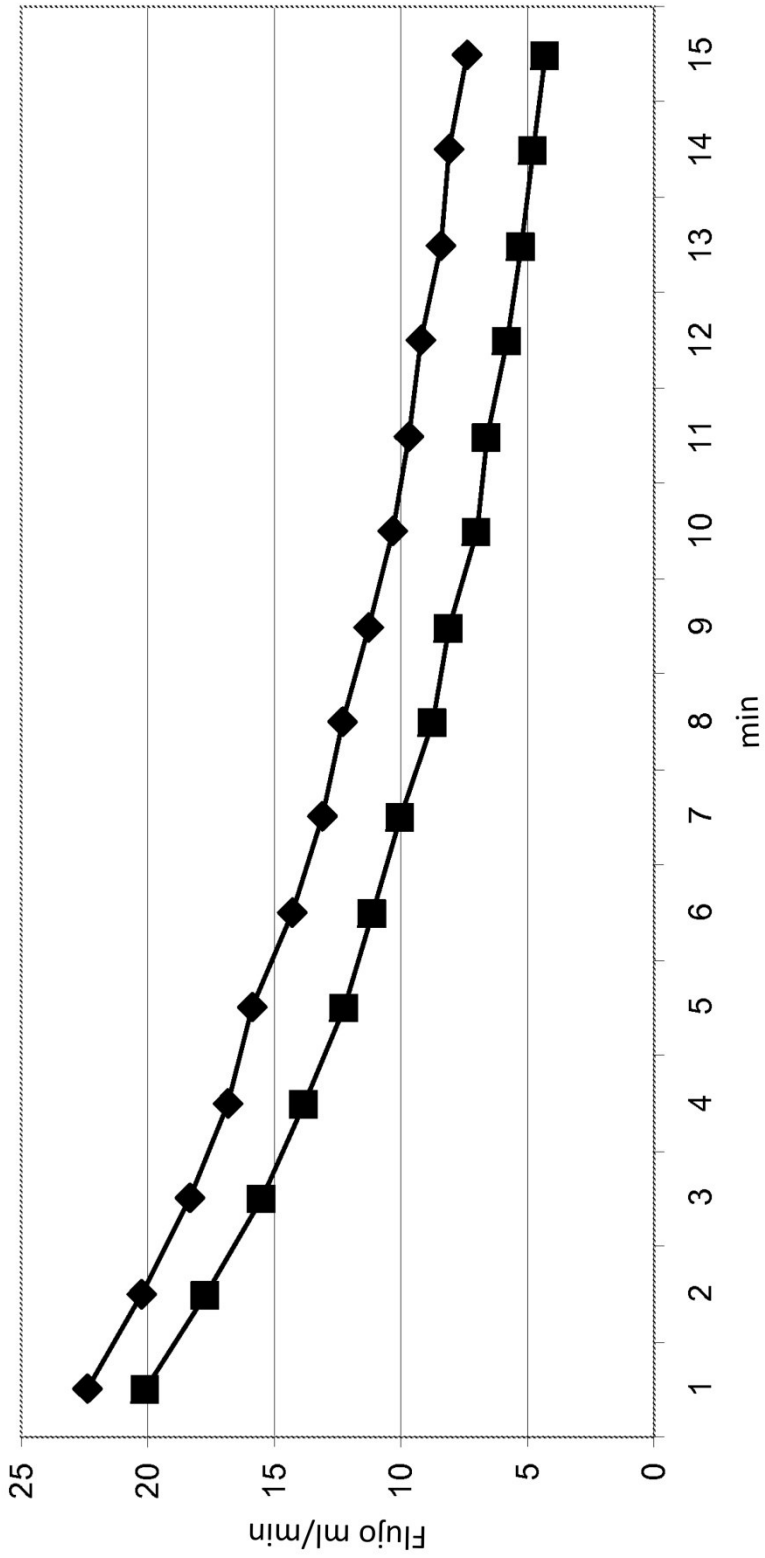


Fig. 3

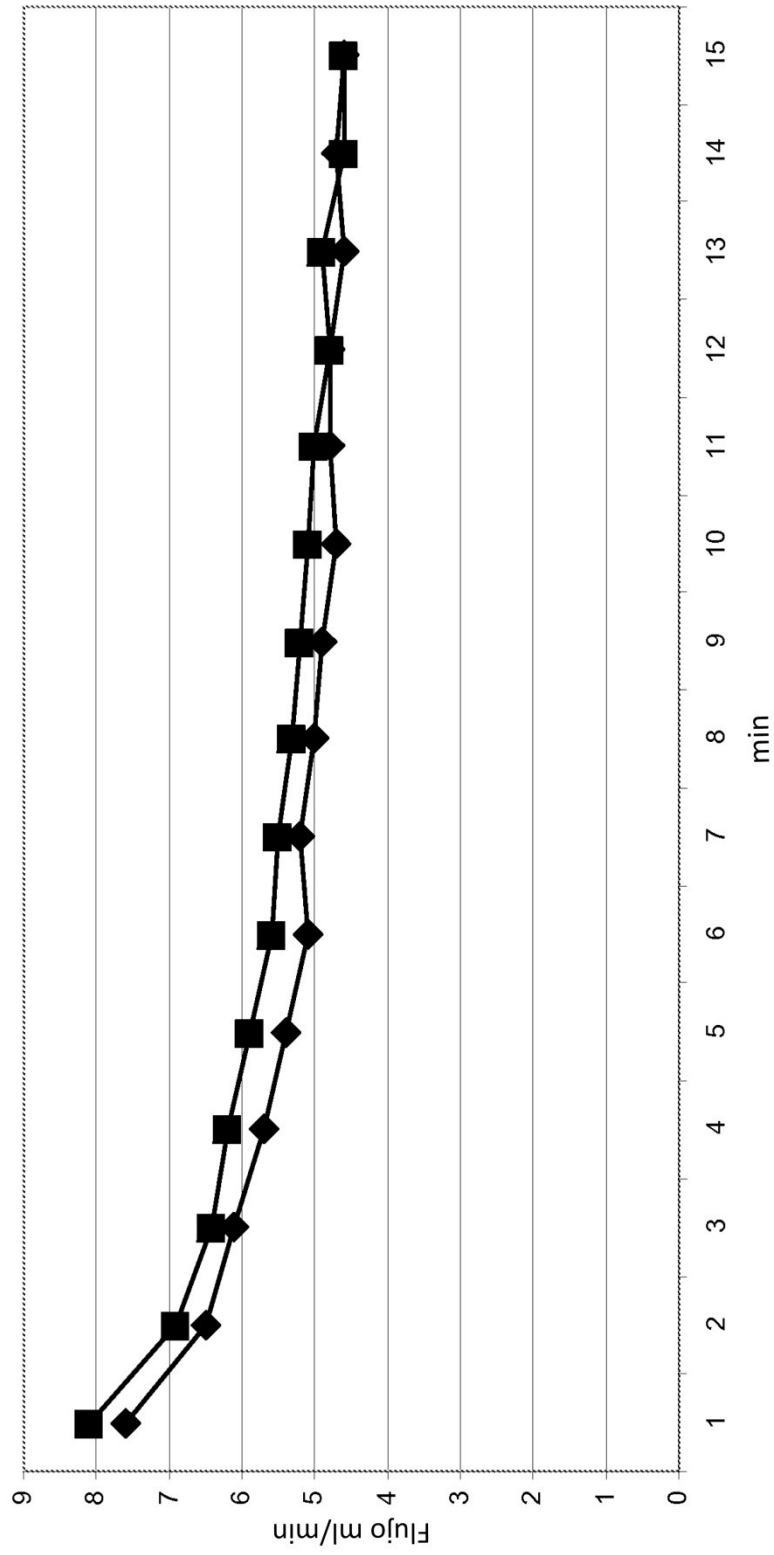


Fig. 4

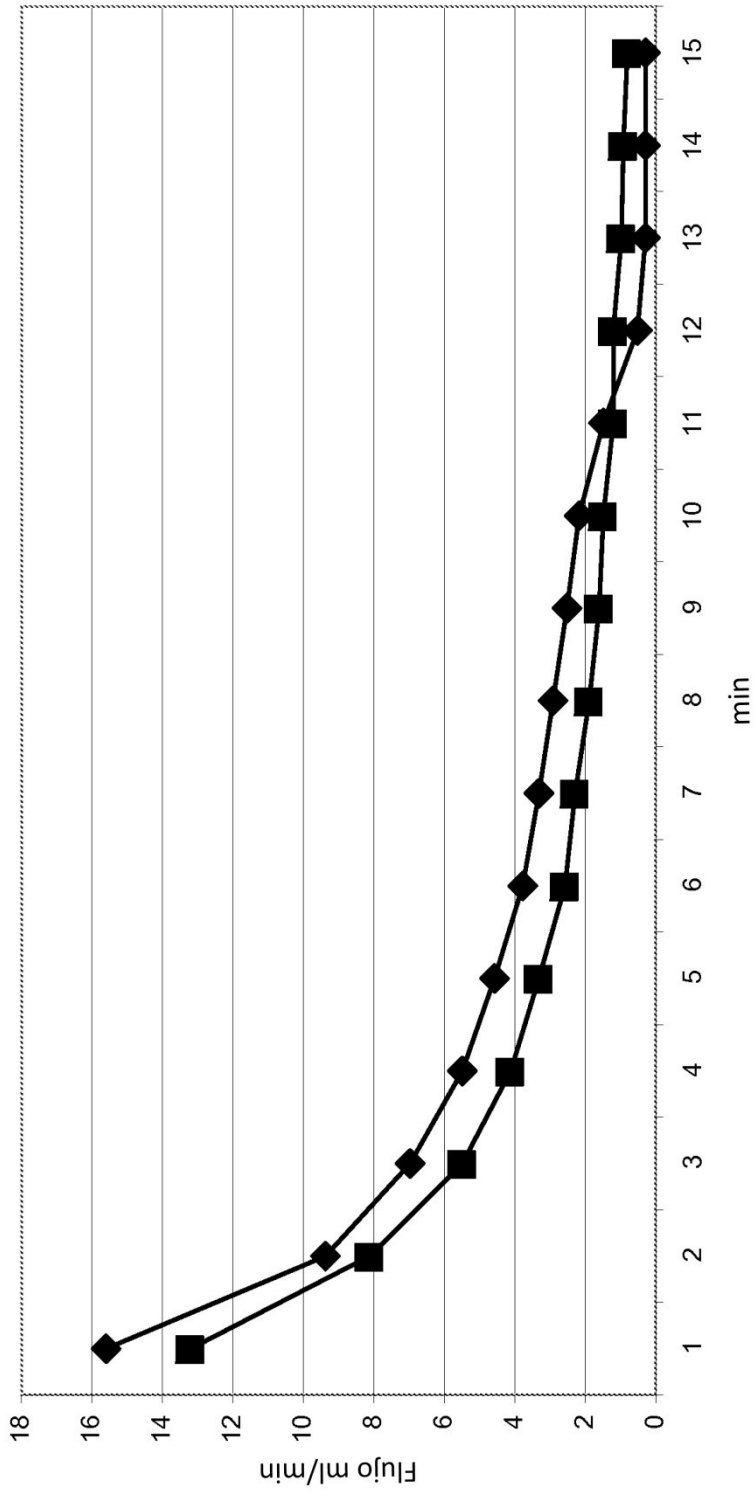


Fig. 5

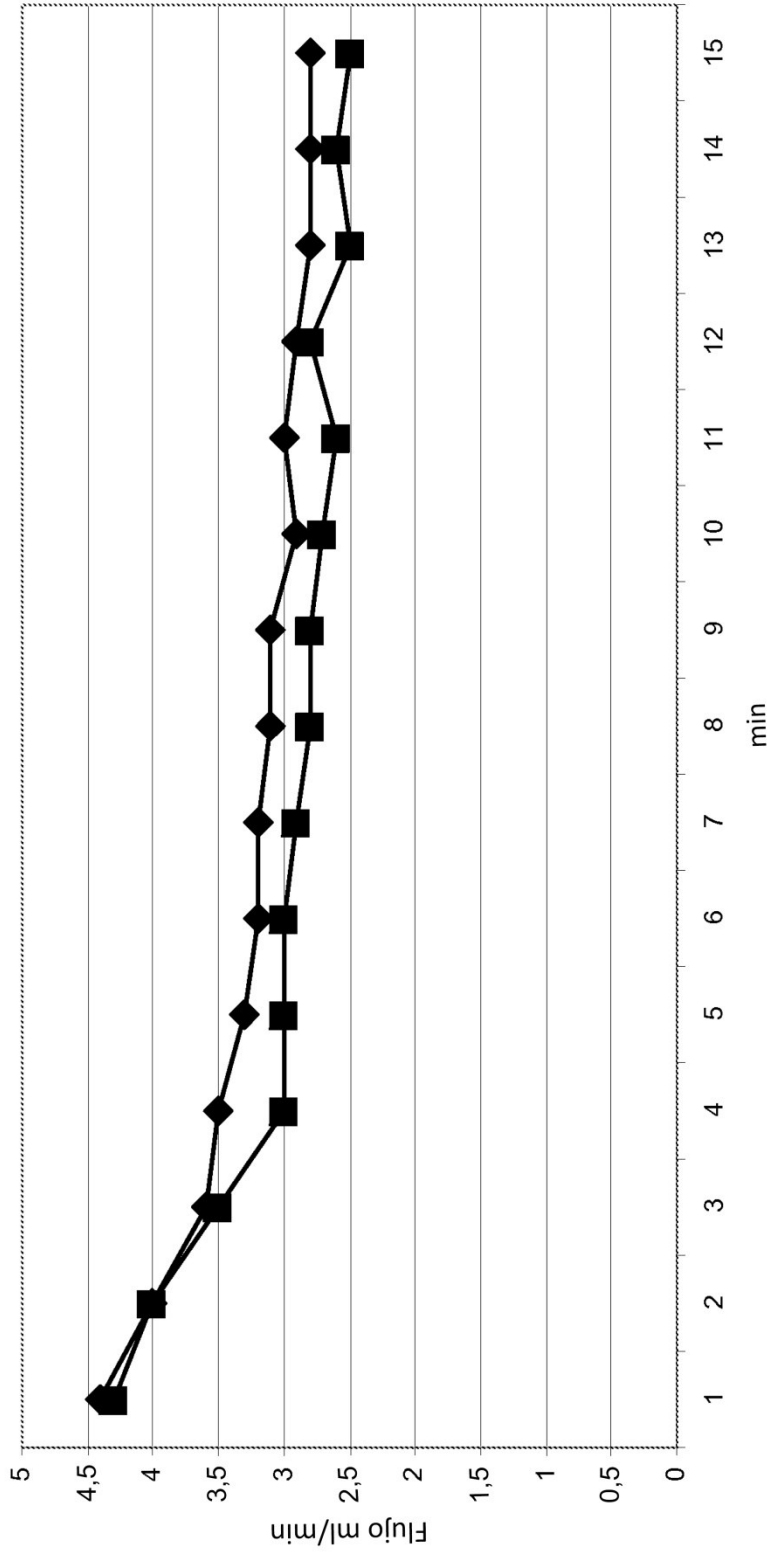


Fig. 6

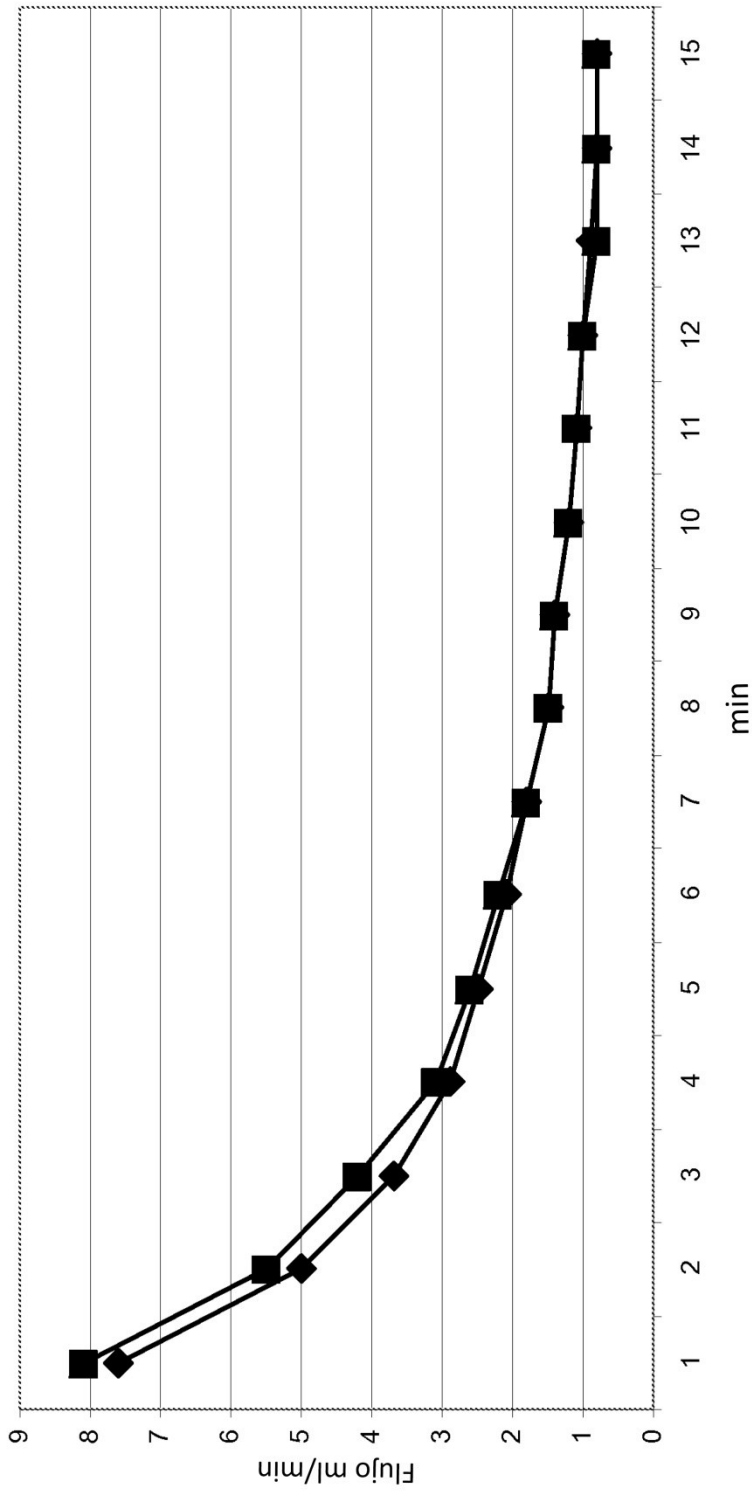


Fig. 7

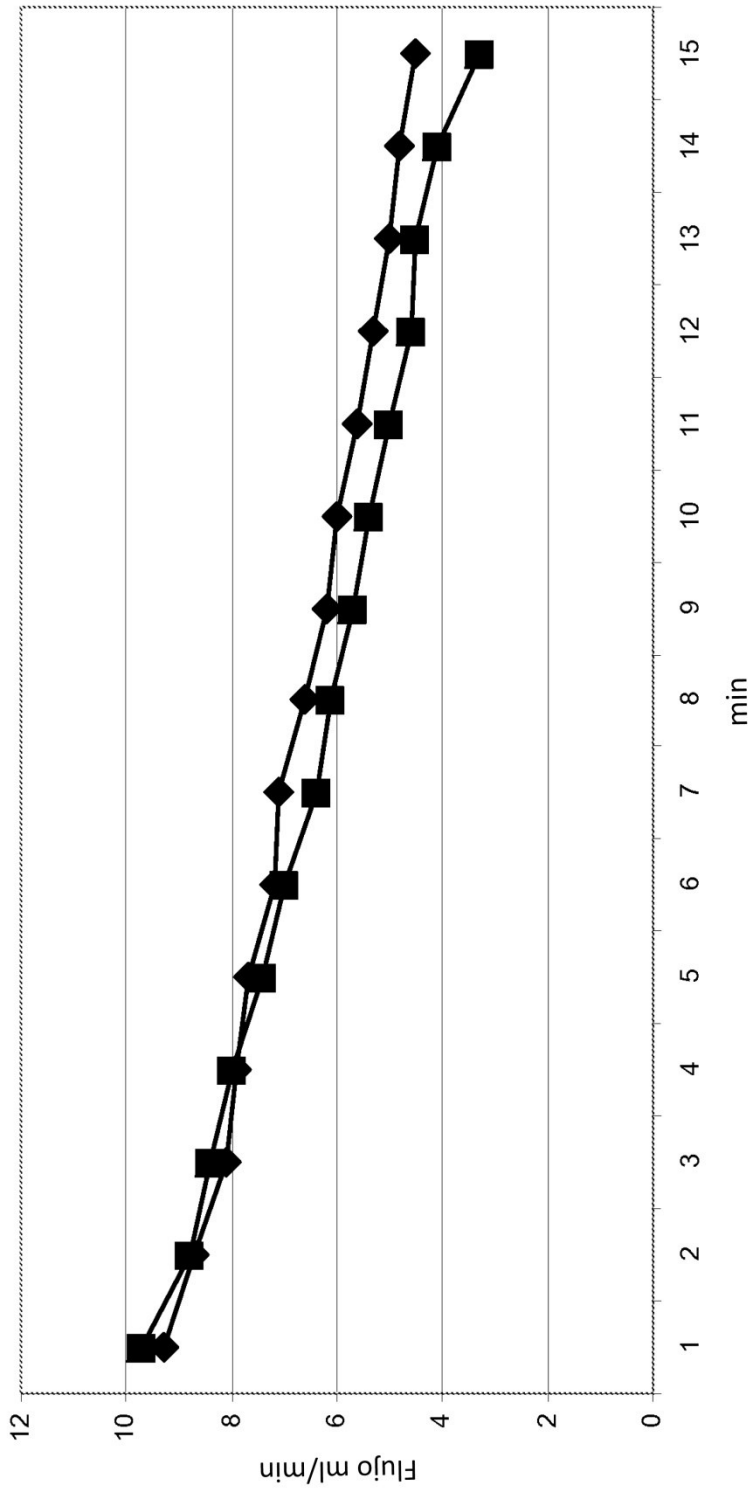


Fig. 8

