

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 232**

51 Int. Cl.:

B01J 20/285	(2006.01) B01D 37/00	(2006.01)
B01J 20/288	(2006.01) C08F 20/56	(2006.01)
B01J 20/289	(2006.01) C08F 220/58	(2006.01)
B01J 20/32	(2006.01) C08F 220/56	(2006.01)
B01J 39/26	(2006.01) C08F 259/08	(2006.01)
C07K 1/14	(2006.01) C08F 220/18	(2006.01)
C07K 1/18	(2006.01) C08F 220/54	(2006.01)
C07K 1/34	(2006.01) C08J 5/22	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)	
B01D 15/10	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2014 PCT/US2014/064230**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15088677**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2014 E 14869655 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3079808**

54 Título: **Método de separación de proteína monomérica de agregados de proteínas con una membrana porosa que comprende un copolímero de acrilamida de bencilo y acrilamida**

30 Prioridad:

12.12.2013 US 201361915125 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.03.2021

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
400 Summit Drive
Burlington, MA 01803, US**

72 Inventor/es:

**KOZLOV, MIKHAIL;
CATALDO, WILLIAM y
CARON, JEFFREY**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 810 232 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

Método de separación de proteína monomérica de agregados de proteínas con una membrana porosa que comprende un copolímero de acrilamida de bencilo y acrilamida

Campo de la invención

Las realizaciones desveladas en el presente documento se refieren a métodos de retirada de impurezas, incluyendo agregados de proteínas, de preparaciones biofarmacéuticas que contienen un producto de interés usando un filtro que contiene acrilamida.

Antecedentes

Los procesos convencionales para la purificación de proteínas implican, típicamente, métodos de cultivo de células, por ejemplo, que usan líneas de células de mamíferos o bacterianas diseñadas de manera recombinante para producir la proteína de interés (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal), seguido de una etapa de extracción de células para retirar células y restos celulares de un caldo de cultivo de células. La etapa de extracción de células normalmente va seguida de una etapa de captura, que típicamente va seguida de una o más etapas cromatográficas, también denominadas etapas de pulido, que normalmente incluyen una o más de cromatografía de intercambio catiónico y/o cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatografía de interacción hidrófoba y/o cromatografía de modo mixto y/o cromatografía de hidroxipatita. También se puede incluir una etapa de inactivación de virus después de la etapa de captura. Las etapas de pulido normalmente van seguidas de una filtración y ultrafiltración/diafiltración de virus, que completa el proceso de purificación. Véanse, por ejemplo, Shukla et al., J. Chromatography B., 848 (2007) 28-39; Liu et al., MAbs, 2010: sep-oct 2(5): 480-499.

La etapa de filtración de virus es una etapa importante en la purificación de proteínas, especialmente cuando se desea que el producto se use en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. La etapa de filtración de virus típicamente emplea filtros de retención de virus que retienen las partículas de virus, al tiempo que permiten el paso a través de la proteína de interés. Uno de los objetivos para lograr una filtración de virus eficaz es que algunas de las impurezas, especialmente los agregados de proteínas, tengan un tamaño similar a las partículas de virus. Por consiguiente, los agregados de proteínas terminan obstruyendo o taponando el filtro de retención de virus, reduciendo significativamente, de ese modo, el flujo de la proteína de interés a través del filtro.

Las impurezas, tales como los agregados de proteínas, se forman en diferentes fases del proceso de purificación y, con el fin de mantener una capacidad de producción adecuada de los filtros de retención de virus, los agregados de proteínas necesitan retirarse antes de llegar a los filtros de retención de virus. Se han realizado intentos en la técnica anterior para implementar la retirada de agregados de flujo a través basándose en medios de cromatografía de interacciones hidrófobas (HIC en inglés) (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.427.659). Sin embargo, las separaciones preparativas basadas en HIC tienen una aplicabilidad estrecha debido al desarrollo de proceso generalmente difícil, la ventana de operación estrecha y la concentración alta de sal requerida en el tampón.

La cromatografía de reparto débil (WPC en inglés) es otro modo de operación cromatográfica, en la que el producto se une más débil que en el caso de la cromatografía de unión-elución, pero más fuerte que en el caso de la cromatografía de flujo a través (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 8.067.182); sin embargo, la WPC también tiene determinados inconvenientes asociados a la misma, incluyendo, una ventana de operación estrecha y una capacidad de unión inferior para la retirada de impurezas, en comparación con los métodos de unión y elución.

Además, una de las maneras más convenientes de retirar selectivamente los agregados de proteínas es mediante el paso de una solución de proteínas y/u otras biomoléculas a través de un medio de filtración antes de llegar al filtro de retención de virus, mediante el que se retiran los agregados de proteínas, lo que permite que la proteína que se purifica fluya a través del filtro de retención vírica. Se pueden hallar ejemplos de tales filtros en la patente estadounidense n.º 7.118.675, que analiza la filtración de una solución de proteínas y virus a través de un filtro de profundidad de adsorción o una membrana cargada o modificada en superficie, antes de la etapa de filtración de virus.

Adicionalmente, la publicación de PCT n.º W02010/098867 analiza el uso de un medio poroso cargado negativamente para la retirada de agregados de proteínas y la publicación de PCT n.º WO2012/175156 analiza un filtro basado en poliamida para la retirada de agregados de proteínas. Finalmente, la solicitud estadounidense con n.º de serie 13/783.941, US 20130245139 A1, presentada el 4 de marzo de 2013, analiza el uso de composiciones que comprenden grupos de intercambio catiónico para la retirada de agregados de proteínas, sin embargo, las composiciones descritas en la misma operan bien solo en condiciones de pH y conductividad adecuadas para la cromatografía de intercambio catiónico.

Sumario

Las realizaciones desveladas en el presente documento proporcionan composiciones novedosas para la retirada de impurezas, tales como, los agregados de proteínas, de una muestra que contiene una proteína de interés, por ejemplo,

un anticuerpo. Por consiguiente, tales composiciones se pueden usar antes de la etapa de filtración de virus durante la purificación de proteínas, para retirar los agregados y proteger el filtro de virus de la obstrucción, lo que mejora, por lo tanto, la capacidad del filtro de virus.

- 5 Las composiciones descritas en el presente documento proporcionan ventajas sobre las composiciones previamente conocidas usadas antes de la etapa de filtración de virus para retirar las impurezas, tales como agregados de proteínas, ya que se pueden usar en un amplio intervalo de condiciones de solución.

10 En algunas realizaciones, las composiciones están cargadas negativamente. En otras realizaciones, las composiciones son neutras (hidrófobas).

En algunas realizaciones, las composiciones se pueden usar en condiciones de pH bajo y conductividad baja (por ejemplo, las composiciones cargadas negativamente). En otras realizaciones, las composiciones se pueden usar en condiciones de pH neutro a más alto y conductividad moderada a alta (por ejemplo, las composiciones hidrófobas).

15 La presente invención se refiere a un método de separación de una proteína monomérica de interés de agregados de proteínas en una muestra, donde el método comprende poner en contacto la muestra con una membrana porosa que comprende un copolímero de acrilamida de bencilo y acrilamida, en donde la membrana se une selectivamente a los agregados de proteínas, para separar, de ese modo, la proteína monomérica de interés de los agregados de proteínas.

20 El método se puede realizar en condiciones propicias para la interacción hidrófoba, por ejemplo, condiciones de pH neutro a más alto y conductividad moderada a alta:

donde X, y y z son fracciones molares promedias de cada monómero en el copolímero y varían independientemente de aproximadamente 0,01 a 0,99;

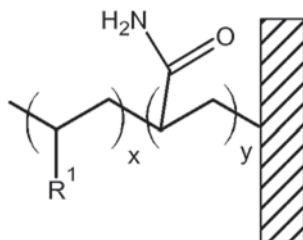
25 R^1 es un grupo de unión hidrófobo alifático o hidrófobo aromático seleccionado del grupo que consiste en un grupo etilo, un grupo butilo, un grupo hexilo, un grupo 2-etilhexilo, un grupo dodecilo, un grupo estearilo, un grupo hidroxipropilo, un grupo fenilo y un grupo bencilo;

30 R^2 es un conector orgánico alifático o aromático no cargado entre dos polímeros derivados de un monómero polimerizable seleccionado del grupo que consiste en acrilatos, acrilamidas, metacrilatos, éteres de vinilo y estirénicos; y

m indica que una cadena de copolímero similar se fija en el otro extremo del conector.

En algunas realizaciones, un copolímero, de acuerdo con las composiciones descritas en el presente documento, comprende la siguiente estructura:

35



Fórmula B

donde x e y son fracciones molares promedias de cada monómero en el copolímero y varían independientemente de aproximadamente 0,01 a 0,99; y

40 R^1 es un grupo de unión hidrófobo alifático o hidrófobo aromático seleccionado del grupo que consiste en un grupo etilo, un grupo butilo, un grupo hexilo, un grupo 2-etilhexilo, un grupo dodecilo, un grupo estearilo, un grupo hidroxipropilo, un grupo fenilo y un grupo bencilo, donde el copolímero se injerta mediante enlace covalente en un soporte sólido, mostrado como rectángulo.

45 En diversas estructuras descritas en el presente documento, el grupo de unión hidrófobo es un grupo acrilamida de bencilo. En determinadas realizaciones, se proporciona un tren de filtración que incluye uno o más de un prefiltro, un filtro clarificador, medios de cromatografía (por ejemplo, de intercambio catiónico, intercambio aniónico), un adsorbente de membrana y un filtro de depuración vírica para retirar los contaminantes del producto/proceso.

50 En determinadas realizaciones, el prefiltro comprende un soporte sólido poroso que comprende un copolímero que comprende al menos dos monómeros, en donde al menos uno de los monómeros comprende acrilamida y al menos un segundo monómero comprende un grupo de unión hidrófobo.

Breve descripción de los dibujos

55

La Figura 1 representa un gráfico de contorno que demuestra la capacidad de producción de un filtro de virus Viresolve® Pro, cuando se usa un prefiltro cargado negativamente aguas arriba del filtro de virus con una solución

de alimentación de IgG a diferentes valores de pH y conductividad. El eje X representa la conductividad (mS/cm) y el eje Y derecho representa el pH.

La Figura 2 representa un gráfico de barras que demuestra las capacidades de producción en masa del filtro de virus Viresolve® Pro (VPro), cuando se usan los siguientes prefiltros aguas arriba del filtro de virus: prefiltro que contiene AMPS al 1,8 % y AM al 3,0 % (3); prefiltro que contiene AMPS al 1,5 % y DMAM al 3,3 % (4); prefiltro que contiene AMPS al 1,8 % y DMAM al 3,0 % (5); prefiltro que contiene AMPS al 2,1 % y DMAM al 2,7 % (6); prefiltro que contiene AMPS al 2,4 % y DMAM al 2,4 % (7); prefiltro que contiene AMPS al 4,8 % y DMAM al 0 % (8); prefiltro que contiene AMPS al 1,5 % y BMA al 3,3 % (9); prefiltro que contiene AMPS al 1,8 % y BMA al 3,0 % (10); prefiltro que contiene AMPS al 2,1 % y BMA al 2,7 % (11); prefiltro que contiene AMPS al 1,8 % e IOA al 3,0 % (12); prefiltro que contiene AMPS al 1,8 % e IOA al 6,0 % (13); prefiltro que contiene AMPS al 1,5 % y HPMAM al 3,3 % (14) y prefiltro que contiene AMPS al 2,5 % y HPMAM al 2,3 % (15). Las dos primeras barras en el gráfico de barras representan controles: filtro de virus solo (1) y membrana de base de prefiltro sin ninguna modificación (2). El eje X representa las composiciones de prefiltro y el eje Y representa la capacidad de producción en masa en kg de IgG/m² del filtro de membrana de virus a V75. El área del prefiltro respecto al filtro de virus es de 1:1 a 3,1 cm².

La Figura 3 representa un gráfico que demuestra las curvas de volumen frente a tiempo de soluciones de tampón y proteínas en diversas combinaciones de prefiltro/filtro de virus (Tabla 2). Las pendientes de las curvas corresponden a las permeabilidades. El eje X representa el tiempo (min) y el eje Y representa el volumen (ml). El prefiltro que contiene AMPS al 1,8 % y AM al 3,0 % (3) es el único tren que muestra un aumento en la permeabilidad en presencia de IgG en el mismo tampón usado para el flujo inicial.

La Figura 4 representa un gráfico de barras que representa los cambios de permeabilidad (eje y en LMH/kPa (psi)) de los trenes de filtración de las diversas combinaciones de prefiltro/filtro de virus, eje x (Tabla 2), a medida que cambian de la solución de tampón solo a las soluciones de IgG en el mismo tampón. El tren que contiene el prefiltro (3) que contiene AMPS al 1,8 % y AM al 3,0 % es el único tren que muestra un aumento en la permeabilidad en presencia de IgG.

La Figura 5 representa una ilustración del posible mecanismo para el aumento de la permeabilidad observado en las Figuras 3 y 4 con la superficie de membrana que contiene acrilamida (prefiltro 3). El aumento en la permeabilidad de la combinación de prefiltro 3/VPro (Tabla 2) es el resultado de la superficie única de hidrogel cargada negativamente que contiene acrilamida que se contrae por las interacciones iónicas con la IgG cargada positivamente.

La Figura 6 representa las capacidades de unión estáticas de IgG (eje y en mg de IgG/ml de membrana) de diversas membranas modificadas en superficie con CEX en la Tabla 3 a pH 4,0 y a diferentes conductividades de solución (eje x, mS/cm). La presencia de la acrilamida pequeña, neutra e hidrófila con el grupo de unión de CEX AMPS en las membranas 3 y 17 permite un hidrogel de polímero único que proporciona mayores capacidades de IgG estáticas a conductividades de ≤ 25 mS/cm.

La Figura 7 representa las capacidades de unión de agregado (eje y, mg/ml) de IgG de las diversas membranas modificadas en superficie con CEX (eje x) en la Tabla 3 después de cargas dinámicas equivalentes en condiciones de unión de CEX a las membranas. Las eluciones de CEX después de una carga equivalente se usan para determinar la capacidad de IgG, la selectividad de agregado mediante cromatografía de exclusión por tamaños (SEC en inglés) analítica y para calcular la capacidad de agregado de las membranas en la Tabla 4. La capacidad de agregado de CEX dinámica se mide en las membranas en la Tabla 3 para cuantificar las diferencias de selectividad de agregado de las membranas en la Tabla 3.

La Figura 8 muestra que las membranas con capacidades de agregado más altas (Tabla 4, Figura 7) tienden a proporcionar una mejor protección del filtro de virus (Viresolve® Pro), lo que produce, de ese modo, capacidades de producción en masa de IgG más altas (eje Y derecho) usando el proceso del Ejemplo 1.

La Figura 9 es un cromatograma representativo de una superposición de SEC-HPLC normalizada (el eje y es abs. de UV a 230 nm y el eje x es minutos) que incluye la solución de carga de alimentación y las eluciones de las membranas 3, 16, 5 y 8 de la Tabla 4. La superposición muestra que la retirada por elución de la membrana 3 que contiene acrilamida tiene un porcentaje de agregados más alto que las membranas 8 y 16 sin un comonomero neutro o la membrana 5 con el comonomero DMAM. Este resultado demuestra que la presencia de acrilamida mejora la selectividad de membrana de los agregados (área de pico mayor de 6-8,5 minutos).

Las Figuras 10, 11 y 12 muestran que las membranas 3 y 4 (Tabla 5) modificadas con BAM al 2,5 %, acrilamida al 1,0 o 2,0 % proporcionan una protección mayor (kg/m², eje y) del filtro de retirada de virus (mayor capacidad de producción en masa a pH 7,0 y 5 mS/cm, pH 7,5 y 15 mS/cm y pH 6,0 y 25 mS/cm) que las membranas 5, 6, 7 u 8 (Tabla 5, eje x) que no contenían acrilamida. Las membranas 3 y 4 que contienen acrilamida también proporcionan una capacidad de producción en masa similar al prefiltro de virus (prefiltro Viresolve®) (mecanismo principalmente hidrófobo) y una capacidad de producción mucho mejor que el protector Viresolve® (mecanismo de CEX) en las 3 condiciones de solución.

La Figura 13 muestra que la membrana (3) (Tabla 5 y 6) proporciona una mayor protección (kg/m², eje y) del filtro de retirada de virus a pH 6,0 y 25 mS/cm que los prefiltros disponibles en el mercado y las membranas no modificadas de la Tabla 6.

La Figura 14 (Tabla 7) muestra que la membrana (3) es eficaz para reducir el aumento de presión (eje y) en comparación con el VPro no prefiltrado para reducir la obstrucción y proporcionar una mayor capacidad de producción en masa (eje x) del VPro de MAb01 a pH 7,0, 4,2 mS/cm, 15,3 g/l, a 0,22 ml/min (166 LMH), que contiene el 0,8 % de agregados mediante SEC-HPLC.

La Figura 15 (Tabla 7) muestra que la membrana (3) protege el VPro para mejorar la capacidad de producción en

masa (eje x) 4x de MAb 05 mediante la reducción de la presión (eje y), lo que es indicativo de la obstrucción, en comparación con el VPro no prefiltrado de MAb05 a pH 7,5, 18 mS/cm, 9,2 g/l, a 0,22 ml/min (166 LMH), que contiene el 0,4 % de agregados mediante SEC-HPLC.

La Figura 16 (Tabla 7) muestra que la membrana (3) protege el VPro para mejorar la capacidad de producción en masa (eje x, kg/m²) mediante la reducción del aumento de presión (eje y), lo que es indicativo de la obstrucción, mejor que la filtración de virus de VPro sin prefiltración y con los prefiltros de membrana no modificada compuestos de poliamida (5) y el filtro de membrana de calidad esterilizante comercial (4) de MAb07 a pH 7,0, 8 mS/cm, 8 g/l, a 0,22 ml/min (166 LMH), que contiene el 4 % de agregados mediante SEC-HPLC.

Descripción detallada

Con el fin de que las realizaciones desveladas en el presente documento se puedan entender más fácilmente, se definen en primer lugar determinados términos y expresiones. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

I. Definiciones

El término "cromatografía", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de técnica que separa el producto de interés (por ejemplo, una proteína o un anticuerpo terapéutico) de contaminantes y/o agregados de proteínas en una preparación biofarmacéutica.

Las expresiones "proceso de flujo a través", "modo de flujo a través" y "cromatografía de flujo a través" tal como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a una técnica de separación de productos en la que una preparación biofarmacéutica que contiene el producto de interés está destinada al flujo a través de un material. En algunas realizaciones, el producto de interés fluye a través del material y las entidades no deseables se unen al material. En diversas realizaciones descritas en el presente documento, el producto de interés fluye a través de un material que contiene acrilamida. En una realización particular, el material contiene un copolímero que comprende acrilamida, donde el material se usa antes de la etapa de filtración de virus en un proceso de purificación de proteínas, es decir, como filtro de virus.

Los términos "contaminante", "impureza" y "restos", tal como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a cualquier molécula extraña u objetable, incluyendo una macromolécula biológica, tal como un ADN, un ARN, una o más proteínas de célula hospedadora, endotoxinas, lípidos, agregados de proteínas y uno o más aditivos, que puede estar presente en una muestra que contiene el producto de interés que se separa de una o más de las moléculas extrañas u objetables. Adicionalmente, tal contaminante puede incluir cualquier reactivo que se use en una etapa que se pueda producir antes del proceso de separación. En una realización particular, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento están destinados a retirar selectivamente los agregados de proteínas, de una muestra que contiene un producto de interés. En algunas realizaciones, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento se usan antes de una etapa de filtración de virus, retirando, de ese modo, los agregados de proteínas y otras impurezas que obstruyen el filtro de retención de virus y afectan negativamente a la permeabilidad de la proteína de interés a través del filtro.

El término "inmunoglobulina", "Ig" o "anticuerpo" (usado indistintamente en el presente documento) se refiere a una proteína que tiene una estructura de cadena básica de cuatro polipéptidos que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, mediante enlaces de disulfuro entre cadenas, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. La expresión "inmunoglobulina de cadena individual" o "anticuerpo de cadena individual" (usada indistintamente en el presente documento) se refiere a una proteína que tiene una estructura de cadena de dos polipéptidos que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera, estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, mediante conectores de péptidos entre cadenas, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende bucles de péptido (por ejemplo, que comprende de 3 a 4 bucles de péptido) estabilizados, por ejemplo, mediante una lámina plisada en β y/o un enlace de disulfuro entre cadenas. Los dominios se denominan, además, en el presente documento como "constantes" o "variables", basándose en la relativa falta de variación de secuencias dentro de los dominios de diversos elementos de clase, en el caso de un dominio "constante", o la variación significativa dentro de los dominios de diversos elementos de clase, en el caso de un dominio "variable". Los "dominios" de anticuerpos o polipéptidos a menudo se denominan indistintamente en la técnica como "regiones" de anticuerpos o polipéptidos. Los dominios "constantes" de las cadenas ligeras de anticuerpos se denominan indistintamente como "regiones constantes de cadena ligera", "dominios constantes de cadena ligera", regiones de "CL" o dominios de "CL". Los dominios "constantes" de las cadenas pesadas de anticuerpos se denominan indistintamente como "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones de "CH" o dominios de "CH". Los dominios "variables" de las cadenas ligeras de anticuerpos se denominan indistintamente como "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de cadena ligera", regiones de "VL" o dominios de "VL". Los dominios "variables" de las cadenas pesadas de anticuerpos se denominan indistintamente como "regiones variables de cadena pesada", "dominios variables de cadena pesada", regiones de "VH" o dominios de "VH".

Las inmunoglobulinas o los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, los anticuerpos de IgM que existen en forma pentamérica y/o los anticuerpos de IgA que existen en forma monomérica, dimérica o multimérica. El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o una cadena de anticuerpos que comprende menos residuos de aminoácidos que un anticuerpo o una

5 cadena de anticuerpos intacta o completa. Se pueden obtener fragmentos a través del tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o una cadena de anticuerpos intacta o completa. Los fragmentos también se pueden obtener mediante medios recombinantes. Los fragmentos de ejemplo incluyen los fragmentos de Fab, Fab', F(ab')₂, Fc y/o Fv.

10 La expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una porción de polipéptido de una inmunoglobulina o un anticuerpo que se une a un antígeno o compete con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se derivaron) por la unión al antígeno (es decir, la unión específica). Los fragmentos de unión se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, cadenas individuales y anticuerpos de cadena individual.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a cualquier composición o mezcla que contenga una proteína diana a purificar. Las muestras se pueden derivar de fuentes biológicas o de otro tipo. Las fuentes biológicas incluyen fuentes eucariotas y procariotas, tales como células, tejidos y órganos de plantas y animales. En algunas realizaciones, una muestra incluye una preparación biofarmacéutica que contiene una proteína de interés a purificar. En una realización particular, la muestra es una alimentación de cultivo de células que contiene una proteína de interés a purificar. La muestra también puede incluir diluyentes, tampones, detergentes y especies contaminantes, restos y similares que se hallan mezclados con la proteína diana o proteína de interés. La muestra puede estar "parcialmente purificada" (es decir, haber estado sometida a una o más etapas de purificación, tales como las etapas de filtración) o se puede obtener directamente de una célula u organismo hospedador que produzca la

20 molécula diana (por ejemplo, la muestra puede comprender fluido de cultivo de células extraídas). En algunas realizaciones, una muestra que se somete a los procesos de purificación de flujo a través descritos en el presente documento es un eluido de una etapa de cromatografía de unión y elución, por ejemplo, una cromatografía de afinidad con la proteína A.

30 La expresión "especie de taponamiento de membrana de virus" o "impurezas de taponamiento de membrana de virus" se puede referir a cualquier componente soluble o solubilizado de la solución que contribuya significativamente al bloqueo u obstrucción de los poros de una membrana porosa diseñada para retener partículas víricas, es decir, una membrana de filtración de virus o una membrana de retención de virus. En general, el tamaño de estas especies será mayor que la proteína de interés y, en algunos casos, puede ser comparable al tamaño de las partículas víricas que están destinadas a ser retenidas mediante la membrana de virus.

35 En diversas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento están destinadas a capturar tales especies de taponamiento de membrana de virus y se usan antes de una membrana de retención de virus durante un proceso de purificación de proteínas. En diversas realizaciones, las especies de taponamiento de membrana de virus incluyen agregados de proteínas.

La expresión "agregado de proteínas" o "agregados de proteínas", tal como se usa indistintamente en el presente documento, se refiere a una asociación de al menos dos moléculas de un producto de interés, por ejemplo, una proteína o un anticuerpo terapéutico. La asociación de al menos dos moléculas de un producto de interés puede surgir

45 mediante cualquier medio que incluya, pero sin limitación, reticulación covalente, no covalente, de disulfuro o no reducible.

La concentración de agregado se puede medir en una muestra de proteína usando cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), un método bien conocido y ampliamente aceptado en la técnica (véase, por ejemplo, Gabrielson et al., J. Pharm. Sci., 96, (2007), 268-279). Las concentraciones relativas de especies de diversos pesos moleculares se miden en el efluente usando absorbancia de UV, mientras que los pesos moleculares de las fracciones se determinan mediante la realización de la calibración de sistema siguiendo las instrucciones del fabricante de la columna.

50 El término "dímero", "dímeros", la expresión "dímero de proteína" o "dímeros de proteína", tal como se usa indistintamente en el presente documento, se refiere a una fracción de orden inferior de agregados de proteínas, que se compone predominantemente de agregados que contienen dos moléculas monoméricas, pero también puede contener una determinada cantidad de trímeros y tetrameros. Esta fracción normalmente se observa como primer pico resoluble en un cromatograma SEC inmediatamente antes del pico de monómero principal.

60 La expresión "agregados de alto peso molecular" o "HMW", tal como se usa indistintamente en el presente documento, se refiere a una fracción de orden superior de agregados de proteínas, es decir, pentámeros y superiores. Esta fracción normalmente se observa como uno o más picos en un cromatograma SEC antes del pico de dímero.

65 El término "soporte sólido", tal como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a cualquier material (poroso o no poroso) que incluye un copolímero que comprende acrilamida y un grupo de unión hidrófobo. Los ejemplos de formatos de soportes sólidos usados en los métodos y las composiciones descritos en el presente

documento incluyen, pero sin limitación, membranas, perlas porosas, fibras aladas, monolitos, resinas cromatográficas, tejidos tejidos y tejidos no tejidos.

El término "selectividad", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la relación adimensional de los coeficientes de reparto de dos especies entre una fase móvil y una fase estacionaria. Un coeficiente de reparto (K_p) es la relación Q/C , donde Q y C son las concentraciones de proteínas unidas y libres, respectivamente.

La expresión "grupo de unión hidrófobo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un residuo "hidrófobo" orgánico alifático o aromático no polar que se puede asociar intramolecularmente con otra superficie hidrófoba, lo que se define como interacción hidrófoba. Los grupos hidrófobos de ejemplo son alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, fluoroalquilo, arilo y similares. En una realización particular, un grupo de unión hidrófobo es bencilacrilamida.

La expresión "pH neutro a más alto" se refiere a un pH de 6 o mayor en la escala de 0-14 determinado a partir del equilibrio de los iones en el agua que es $[H_3O^+][OH^-] = 1,0 \times 10^{-14}$, donde $pH = -\log [H_3O^+]$.

La expresión "conductividad moderada a alta" se refiere a una condición de solución donde la conductividad iónica medida en miliSiemens/centímetro es igual a o típicamente mayor de 5 mS/cm. La conductividad de solución es la conductividad eléctrica de una solución con electrolitos que se mide mediante la determinación de la resistencia de la solución entre dos electrodos planos o cilíndricos separados por una distancia fija.

El término "prefiltro vírico" o "prefiltro" se refiere a un medio, una membrana o un dispositivo de filtración de flujo normal usado aguas arriba de un filtro de virus o filtro de retención vírica y que se usa para mejorar la capacidad de producción del filtro de virus mediante la retirada de impurezas que taponan prematuramente el filtro de virus, tales como, por ejemplo, los agregados de proteínas.

La expresión "filtro de virus" o "filtro de retención vírica" se refiere a una membrana o un medio que retiene virus o partículas víricas del orden de 20-100 nm mediante un mecanismo de exclusión por tamaños, para proporcionar una depuración vírica durante un proceso de purificación de proteínas. Los ejemplos de filtros de retención de virus incluyen Viresolve® Pro, Viresolve® NFP y Viresolve® NFR.

II. Soportes sólidos de ejemplo

Las realizaciones desveladas en el presente documento proporcionan soportes sólidos que comprenden un copolímero, donde al menos uno de los monómeros es acrilamida. Los soportes sólidos descritos en el presente documento se unen a especies o impurezas de taponamiento de filtro de virus, tales como, los agregados de proteínas, más favorablemente que la forma monomérica de una proteína que normalmente es el producto de interés. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se contempla la posibilidad de usar cualquier formato de soporte sólido adecuado. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser poroso o no poroso o puede ser continuo, tal como en forma de un monolito o una membrana. El soporte sólido también podría ser discontinuo, tal como en forma de partículas, perlas o fibras. En cualquier caso (continuo o discontinuo), las características importantes del soporte sólido son que estos tienen alta área de superficie, integridad mecánica, integridad en entorno acuoso y capacidad de proporcionar distribución de flujo para garantizar la accesibilidad de los grupos de unión.

Los soportes sólidos porosos continuos de ejemplo incluyen membranas microporosas, es decir, que tiene un tamaño de poro entre aproximadamente 0,05 micrómetros y 10 micrómetros. Las membranas porosas que se pueden usar en las composiciones y los métodos de acuerdo con las realizaciones desveladas en el presente documento se pueden clasificar como de naturaleza simétrica o asimétrica, que se refiere a la uniformidad de los tamaños de poro a través del espesor de la membrana o, en el caso de una fibra hueca, a través de la pared microporosa de la fibra. Tal como se usa en el presente documento, el término "membrana simétrica" se refiere a una membrana que tiene un tamaño de poro sustancialmente uniforme a través de la sección transversal de la membrana. Tal como se usa en el presente documento, el término "membrana asimétrica" se refiere a una membrana en la que el tamaño de poro promedio no es constante a través de la sección transversal de la membrana. En algunas realizaciones, en el caso de las membranas asimétricas, los tamaños de poro pueden variar de manera uniforme o discontinua en función de la localización a lo largo de la sección transversal de la membrana. En algunas realizaciones, las membranas asimétricas pueden tener una relación de los tamaños de poro sobre una superficie externa respecto a los tamaños de poro sobre la superficie externa opuesta, relación que es sustancialmente mayor de uno.

Se puede usar una amplia diversidad de membranas microporosas preparadas a partir de una amplia diversidad de materiales en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos de tales materiales incluyen polisacáridos, polímeros sintéticos y semisintéticos, metales, óxidos de metales, cerámica, vidrio y combinaciones de los mismos.

Los polímeros de ejemplo que se pueden usar para fabricar las membranas microporosas que se pueden usar en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, poliácridamidas sustituidas o no sustituidas, poliestirenos, polimetacrilamidas, poliimidaz, poliácridatos, policarbonatos, polimetacrilatos, polímeros hidrófilos de polivinilo, poliestirenos, polisulfonas, poliétersulfonas, copolímeros de estireno

y divinilbenceno, polisulfonas aromáticas, politetrafluoroetilenos (PTFE), polímeros termoplásticos perfluorados, poliolefinas, poliamidas aromáticas, poliamidas alifáticas, polietilenos de peso molecular ultra alto, difluoruro de polivinilideno (PVDF), poliéter-éter-cetonas (PEEK), poliésteres y combinaciones de los mismos.

- 5 Las membranas microporosas disponibles en el mercado de ejemplo son Durapore® y Millipore Express®, disponibles a través de EMD Millipore Corp. (Billerica, MA); Supor®, disponible a través de Pall Corp. (Port Washington, NY); y Sartopore® y Sartobran®, disponibles a través de Sartorius Stedim Biotech S.A. (Aubagne Cedex, Francia).

- 10 Otros soportes sólidos continuos de ejemplo son los monolitos, tales como los materiales monolíticos CIM®, disponibles a través de BIA Separations (Villach, Austria).

- 15 Los soportes sólidos discontinuos de ejemplo incluyen perlas de cromatografía porosas. Tal como reconocerán fácilmente aquellos expertos en la materia, las perlas de cromatografía se pueden fabricar a partir de una gran diversidad de materiales poliméricos e inorgánicos, tales polisacáridos, acrilatos, metacrilatos, poliestirénicos, éteres de vinilo, vidrio de poro controlado, cerámica y similares.

- 20 Las perlas de cromatografía disponibles en el mercado de ejemplo son CPG, a través de EMD Millipore Corp.; Sepharose®, a través de GE Healthcare Life Sciences AB; TOYOPEARL®, a través de Tosoh Bioscience; y POROS®, a través de Life Technologies.

- Otros soportes sólidos de ejemplo son los materiales fibrosos tejidos y no tejidos, tales como las esteras y los fieltros de fibra, así como las fibras empaquetadas en un alojamiento adecuado, por ejemplo, una columna de cromatografía, un alojamiento de plástico desechable y similares. Los soportes sólidos de ejemplo también incluyen fibras aladas.

25 **III. Grupos de unión de ejemplo**

En diversas realizaciones descritas en el presente documento, las composiciones comprenden un copolímero de acrilamida y un grupo de unión.

- 30 Una gran diversidad de grupos de unión o ligandos se pueden fijar a los soportes sólidos y se pueden usar para la retirada eficaz de agregados de proteínas de una muestra, tal como se describe en el presente documento. En general, el grupo de unión debe poder atraer y unirse a agregados de proteínas en una solución. La atracción de proteínas al grupo de unión puede ser de cualquier tipo, incluyendo iónica (por ejemplo, los grupos de intercambio catiónico), polar, de dispersión, hidrófoba, de afinidad, quelante de metales o de van der Waals.

- 35 Los grupos de unión iónicos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, sulfato, sulfonato, fosfato, fosfonato, carboxilato; amina primaria, secundaria, terciaria y amonio cuaternario; aminas heterocíclicas, tales como piridina, pirimidina, piridinio, piperazina y similares.

- 40 Los grupos polares incluyen una amplia diversidad de entidades químicas que comprenden enlaces químicos polarizados, tales como C-O, C=O, C-N, C=N, C≡N, N-H, O-H, C-F, C-Cl, C-Br, C-S, S-H, S-O, S=O, C-P, P-O, P=O, P-H. Los grupos polares de ejemplo son carbonilo, carboxilo, alcohol, tiol, amida, haluro, amina, éster, éter, tioéster y similares.

- 45 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, las composiciones descritas en el presente documento incluyen un copolímero de acrilamida y un grupo de unión hidrófobo. Los grupos de unión hidrófobos pueden interactuar hidrófobamente. Los grupos hidrófobos de ejemplo son alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, fluoroalquilo, arilo y similares. Los grupos arilo de ejemplo son bencilo, fenilo, naftilo, tolilo y similares.

- 50 Los grupos de unión de afinidad son disposiciones de varias funcionalidades de unión que, en conjunto, proporcionan una interacción altamente específica con la proteína diana. Los grupos de unión de afinidad de ejemplo incluyen proteína A y proteína G y dominios y variantes de las mismas.

- 55 En algunas realizaciones, un grupo de unión es un grupo iónico. En una realización particular, un grupo de unión es un grupo sulfonato cargado negativamente. En general, los grupos sulfonato cargados negativamente tienen varias ventajas. Por ejemplo, estos presentan una amplia aplicabilidad para unir las proteínas cargadas positivamente en la solución; la química es económica y sencilla con muchos métodos de fabricación sintéticos fácilmente disponibles; la interacción entre el grupo de unión y las proteínas se entiende bien (véase, por ejemplo, Stein et al., J. Chrom. B, 848 (2007) 151-158) y la interacción se puede manipular fácilmente mediante la alteración de las condiciones de solución y tal interacción se puede aislar de otras interacciones.

- 60 En algunas realizaciones, un grupo de unión preferido es un grupo hidrófobo. Los grupos de unión hidrófobos ofrecen las ventajas de las especies de solución de unión en las condiciones de conductividad iónica más alta, donde los grupos de unión iónicos son menos eficaces. En una realización particular, un grupo de unión es un grupo hidrocarburo aromático, por ejemplo, un grupo bencilo o, como alternativa, un grupo etilo, un grupo butilo, un grupo hexilo, un grupo 2-etilhexilo, un grupo dodecilo, un grupo estearilo, un grupo hidroxipropilo o un grupo fenilo.

Además de los grupos de unión, el soporte sólido también puede contener grupos neutros (por ejemplo, acrilamida) que están presentes junto con los grupos de unión y sirven para uno cualquiera o más de los siguientes: la separación de los grupos de unión a una distancia óptima entre sí, la provisión de humectabilidad en agua al soporte poroso, la reducción de las interacciones no específicas entre la muestra y el soporte sólido, el control de la absorción de agua y el hinchamiento de la estructura polimérica que contiene grupos de unión, la provisión de propiedades mecánicas adecuadas a la estructura polimérica que contiene grupos de unión, la mejora de la adhesión de la estructura polimérica al soporte sólido, la provisión de interacciones secundarias con la muestra que aumentan la capacidad y/o selectividad.

Los grupos neutros de ejemplo son alcoholes, azúcares, glicoles, éteres, amidas, nitrilos y similares. Un grupo neutro preferido es un grupo amida sencillo, $C(=O)-NH_2$.

IV. Métodos de fijación de los grupos de unión a un soporte sólido

En las composiciones y los métodos descritos en el presente documento, los grupos de unión adecuados (por ejemplo, grupos de unión iónicos o hidrófobos) se fijan a un soporte sólido, para proporcionar una mayor capacidad de unión de los agregados de proteínas frente al producto de interés.

Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento se basan en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que la presencia de acrilamida en la composición potencia significativamente la selectividad de los soportes sólidos de las especies de taponamiento de membrana de virus, incluyendo los agregados de proteínas de mayor orden.

Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento son especialmente eficaces en la retirada de los agregados de proteínas de orden inferior, tales como, por ejemplo, dímeros, trímeros y tetrameros, en un modo de flujo a través, que generalmente son más difíciles de separar de la forma monomérica de las proteínas, en comparación con los agregados de orden superior, tales como, por ejemplo, pentámeros y superiores.

Se puede usar una diversidad de métodos conocidos en la técnica y aquellos descritos en el presente documento para la fijación de grupos de unión a un soporte sólido para su uso en los métodos descritos en el presente documento. En general, los criterios para una fijación exitosa incluyen el logro de la densidad de grupo de unión deseada y la baja tasa de liberación de los grupos de unión (es decir, la baja lixiviación de los grupos de unión). Los grupos de unión se podrían fijar directamente a un soporte sólido o se podrían incorporar a una molécula polimérica, que, a su vez, se puede fijar a un soporte sólido. Como alternativa, los grupos de unión se pueden incorporar a un recubrimiento reticulado aplicado sobre un soporte sólido, con o sin formación de un enlace químico entre el recubrimiento y el soporte sólido.

Se conocen varios métodos en la técnica para la fijación de los grupos de unión a un soporte sólido (véase, por ejemplo, Ulbricht, M., *Advanced Functional Polymer Membranes*, Polymer, 47, 2006, 2217-2262). Estos métodos incluyen, pero sin limitación, la modificación directa del soporte sólido con grupos de unión a través de la química de acoplamiento adecuada; la adsorción y la fijación de moléculas poliméricas. Esto último se puede obtener mediante el injerto "a" (cuando el polímero se prepara previamente antes de la reacción con la superficie) o el injerto "de" (cuando la polimerización se inicia usando los grupos de superficie).

La elección de los monómeros usados en la creación de un polímero que comprende grupos de unión viene dictada por la reactividad de los monómeros. Las reactividades de diversos tipos de monómeros y los efectos sobre la composición de polímero están bien estudiados y documentados (véase, por ejemplo, *Polymer Handbook*, 3ª ed., John Wiley & Sons, 1989, p. II). Los parámetros bien aceptados de los monómeros que predicen la composición del polímero y su estructura son las relaciones de reactividad de los monómeros (véase, por ejemplo, Odian, J., *Principles of Polymerization*, 4ª ed., John Wiley & Sons, 2004, p. 466).

Un método preferido para la fijación de los grupos de unión iónicos o hidrófobos al soporte sólido es una reacción de polimerización *in situ* que incorpora el grupo de unión a un recubrimiento reticulado aplicado sobre el soporte sólido. Este método se desvela en las patentes estadounidenses n.º 4.944.879 y 4.618.533, así como en la publicación de patente estadounidense publicada n.º US2009/208784. Este método es fácil, así como económico. Un monómero neutro que se puede usar para la reducción de la densidad de los ligandos de unión hidrófobos o cargados se puede seleccionar de un gran grupo de monómeros acrílicos, metacrílicos y de acrilamida, tales como, por ejemplo, acrilamida, acrilato de hidroxipropilo, acrilato de hidroxietilo y metacrilato de hidroxietilo. En diversas realizaciones descritas en el presente documento, el monómero neutro es la acrilamida.

Una estructura química representativa de un grupo de unión que contiene polímero, que se recubre sobre un soporte sólido, se representa en la Fórmula A. Con el fin de que el polímero se recubra, generalmente, este se reticula con otros polímeros. En la Fórmula A, se muestra la estructura polimérica en la que R^1 es cualquier residuo orgánico alifático o aromático que contiene un grupo hidrófobo o de intercambio catiónico, tal como, por ejemplo, un grupo orgánico alifático o aromático hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en etilo, butilo, hexilo, 2-etilhexilo,

dodecilo, estearilo, hidroxipropilo, fenilo y bencilo o un grupo de intercambio catiónico seleccionado de un grupo sulfónico, sulfato, fosfórico, fosfónico o carboxílico; R² es cualquier conector orgánico alifático o aromático no cargado, tal como, por ejemplo, acrilatos, acrilamidas, metacrilatos, éteres de vinilo y estirénicos entre dos cualquiera o más cadenas poliméricas.

5 En la estructura polimérica representada en la Fórmula A, x, y y z son fracciones molares promedias de cada monómero en el polímero y varían independientemente de aproximadamente 0,01 a 0,99; y m indica la fijación de un segundo polímero a través del conector.

10 Una estructura química representativa de un grupo de unión que contiene polímero, que se injerta en un soporte sólido, se representa en la Fórmula B. En la Fórmula B, se muestra la estructura polimérica en la que R¹ es cualquier residuo orgánico alifático o aromático que contiene un grupo hidrófobo o de intercambio catiónico, tal como, por ejemplo, un grupo orgánico alifático o aromático hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en etilo, butilo, hexilo, 2-etilhexilo, dodecilo, estearilo, hidroxipropilo, fenilo y bencilo o un grupo de intercambio catiónico seleccionado de un grupo sulfónico, sulfato, fosfórico, fosfónico o carboxílico.

15 En la estructura polimérica representada en la Fórmula B, x e y son las fracciones molares promedias de cada monómero en el polímero y varían independientemente de aproximadamente 0,01 a 0,99.

20 En algunas realizaciones, el polímero que contiene grupos de unión (por ejemplo, grupos de unión hidrófobos) es un copolímero de bloques, lo que significa que este incluye una cadena o un bloque largo de un tipo de monómero, seguido de una cadena o un bloque largo de un tipo diferente de monómero.

En otras realizaciones, el copolímero que contiene grupos de unión contiene los monómeros en un orden aleatorio.

25 En otras realizaciones más, el copolímero que contiene grupos de unión es un copolímero alterno, donde cada monómero siempre está adyacente a dos monómeros de un tipo diferente en cada lado.

30 En otras realizaciones, el copolímero que contiene grupos de unión (por ejemplo, grupos de unión hidrófobos) contiene los monómeros en un orden aleatorio.

En otras realizaciones, el copolímero que contiene grupos de unión es un copolímero alterno, mientras que cada monómero siempre es adyacente a dos monómeros de un tipo diferente.

35 **IV. Dispositivos que incorporan las composiciones descritas en el presente documento**

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento se incorporan a dispositivos. Los dispositivos adecuados para los soportes sólidos, tales como las membranas microporosas, incluyen cartuchos, cápsulas y vainas de filtración. Los dispositivos de ejemplo también incluyen los cartuchos de filtración de placas
40 apiladas desvelados en las publicaciones estadounidenses n.º US20100288690 A1 y US20080257814 A1, incorporadas a modo de referencia en el presente documento. En el caso de estos dispositivos, un soporte sólido se une permanentemente al alojamiento polimérico y los dispositivos tienen una entrada de líquido, una salida y una abertura de ventilación y minimizan, además, el volumen de líquido retenido. Otros dispositivos de ejemplo incluyen los cartuchos de filtro plisados y los cartuchos de filtro enrollados en espiral. Otros dispositivos de ejemplo más son
45 las columnas de cromatografía. Las columnas de cromatografía se pueden producir a partir de varios materiales adecuados, tales como vidrio, metal, cerámica y plástico. Estas columnas se pueden empaquetar con un soporte sólido por parte del usuario final o también se pueden empaquetar previamente por parte de un fabricante y enviarse al usuario final en un estado empaquetado.

50 **V. Métodos de uso de las composiciones y los dispositivos descritos en el presente documento**

Los dispositivos que contienen las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar para la retirada de agregados de proteínas en un modo de flujo a través. Antes de la aplicación para la separación de escala preparativa, el proceso se debe desarrollar y validar en las condiciones de solución adecuadas, tales como el pH y la
55 conductividad, y se debe determinar el intervalo de carga de proteína en el dispositivo. Los métodos para el desarrollo y la validación el proceso son ampliamente conocidos y se ponen en práctica habitualmente en la industria.

Los dispositivos, comúnmente, se lavan, esterilizan y equilibran con una solución de tampón adecuada antes de su uso. La solución de proteína se ajusta hasta una conductividad y un pH deseables y, posteriormente, se bombea a
60 través de un dispositivo a presión constante o flujo constante. El efluente se puede recoger y analizar para determinar el rendimiento de proteína y la concentración de agregado.

En algunas realizaciones, un dispositivo para la retirada de agregados, tal como se describe en el presente documento, se conecta directamente a un dispositivo de filtración de virus que está diseñado para garantizar la retirada basada en
65 el tamaño de partículas víricas, por ejemplo, tal como se enseña en la patente estadounidense n.º 7.118.675, incorporada a modo de referencia en su totalidad en el presente documento.

Las realizaciones se ilustran adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos, que no se deben interpretar como limitantes. Los contenidos de todas las referencias, patentes y solicitudes de patentes publicadas citadas a lo largo de la presente solicitud, así como las Figuras, se incorporan en el presente documento a modo de referencia.

Ejemplo 1. Preparación de filtro cargado negativamente que contiene acrilamida y comparación con filtros que contienen dimetilacrilamida (no de acuerdo con la invención)

Este experimento demuestra el beneficio inesperado de la adición de acrilamida como comonomero para preparar las membranas de adsorción usadas para la retirada de impurezas, tales como los agregados de proteínas.

Se prepara una serie de membranas modificadas en superficie con intercambio catiónico (CEX en inglés) con los grupos de unión, que, en este caso, son residuos de ácido sulfónico cargados negativamente. La densidad de CEX se controla mediante la formulación de la solución reactiva usada para la modificación en superficie. Con el fin de evaluar el efecto del comonomero reactivo no cargado usado para lograr la menor densidad de CEX, los monómeros reactivos no cargados acrilamida (AM), N,N-dimetilacrilamida (DMAM), bencilmecrilato (BMA) o isooctilacrilato (IOA), N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMAM) se añaden en diferentes cantidades a las soluciones reactivas. Los comonomeros se seleccionan para cubrir una diversidad en tamaño y grado de hidrofobicidad o hidrofilia.

Se prepara una serie de soluciones acuosas o de agua:acetonitrilo (50:50) que contienen el monómero de CEX ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AMPS) que varía del 1,5 al 2,5 % en peso, con AM, DMAM, BMA, IOA o HPMAM y los porcentajes de masa fijos del reticulante N,N'-metilbisacrilamida (0,8 % en peso) y el iniciador UV Irgacure 2959 (0,2 % en peso), (2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona). Una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrófila con un tamaño de poro de 0,10 µm y un espesor de 0,100 mm se corta en piezas cuadradas de 14 cm por 14 cm y cada pieza se sumerge en una de las soluciones durante 30 segundos para garantizar una humectación completa. Se retira el exceso de solución y la membrana se expone a la radiación UV. La membrana se enjuaga posteriormente con agua desionizada y se seca al aire. La Tabla 1 enumera las variantes de membranas modificadas en superficie con CEX que se preparan para evaluar el efecto del comonomero.

Tabla 1. Capacidades de producción en masa de un filtro de retención de virus, Viresolve Pro (VPro), usando nuevas membranas de adsorción como prefiltros.

<u>N.º de muestra de membrana</u>	<u>Descripción</u>	<u>AMPS (%) en peso</u>	<u>Comonomero (%) en peso</u>	<u>% de MBAM</u>	<u>Capacidad de producción en masa a V75 (kg/m²)</u>
1	Filtro de virus solo	ND	ND	ND	0,10
2	Membrana de base	ND	ND	ND	0,67
			AM (%)		
3	AMPS al 1,8 %, AM al 3,0 %	1,8	3,0	0,8	1,50
			DMAM (%)		
4	AMPS al 1,5 %, DMAM al 3,3 %	1,5	3,3	0,8	0,64
5	AMPS al 1,8 %, DMAM al 3,0 %	1,8	3,0	0,8	0,94
6	AMPS al 2,1 %, DMAM al 2,7 %	2,1	2,7	0,8	0,56
7	AMPS al 2,4 %, DMAM al 2,4 %	2,4	2,4	0,8	0,70
8	AMPS al 4,8 %, DMAM al 0 %	4,8	0,0	0,8	0,35
			BMA (%)		
9	AMPS al 1,5 %, BMA al 3,3 %	1,5	3,3	0,8	0,64
10	AMPS al 1,8 %, BMA al 3,0 %	1,8	3,0	0,8	0,60
11	AMPS al 2,1 %, BMA al 2,7 %	2,1	2,7	0,8	0,55
			IOA (%)		
12	AMPS al 1,8 %, IOA al 3,0 %	1,8	3,0	0,8	0,34

(continuación)

<u>N.º de muestra de membrana</u>	<u>Descripción</u>	<u>AMPS (% en peso)</u>	<u>Comonómero (% en peso)</u>	<u>% de MBAM</u>	<u>Capacidad de producción en masa a V75 (kg/m²)</u>
13	AMPS al 1,8 %, IOA al 6,0 %	1,8	6,0	0,8	0,22
			HPMAM (%)		
14	AMPS al 1,5 %, HPMAM al 3,3 %	1,5	3,3	0,8	0,61
15	AMPS al 2,5 %, HPMAM al 2,3 %	2,5	2,3	0,8	0,56

La evaluación del prefiltro cargado negativamente que contiene acrilamida y los otros prefiltros que contienen comonómero se realiza mediante la determinación de su rendimiento de prefiltración para mejorar la capacidad de producción de un filtro de retención de virus aguas abajo durante la filtración. La corriente de alimentación contiene agregados de IgG policlonal que generalmente obstruyen rápidamente el filtro de virus que no tiene un prefiltro de virus aguas arriba del filtro. Debido a que el grupo de unión usado está cargado negativamente, se usan condiciones de unión en solución de CEX fuertes de IgG para evaluar el rendimiento del prefiltro.

Se prepara una alimentación de IgG policlonal para el sometimiento a ensayo de la protección ofrecida por un filtro de virus nueva a una concentración de 4,0 g/l de IgG usando polvo de gamma globulina humana de SeraCare Life Sciences, (catálogo n.º HS-470-90) a pH 4 y acetato de sodio 10 mM a 2,0 mS/cm. Los ajustes finales de pH y conductividad se realizan usando HCl 10 M, NaOH o NaCl 4 M y la solución se filtra estéril antes de su uso.

Los dispositivos de microfiltración con áreas de filtración de 3,1 cm² se moldean previamente usando 3 capas de membrana y se ponen en serie a una relación de área de 1:1 con dispositivos Viresolve® Pro Micro (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA). Ambos dispositivos se humedecen previamente y ventilan para retirar el aire usando solo el tampón (pH 4, acetato 10 mM, 2 mS/cm). A presión constante de 206,8 kPa (30 psi), se determina el flujo inicial en ml de tampón por minuto mediante la medición de la masa durante un período de 20 minutos para llegar al valor de permeabilidad inicial. La alimentación se cambia a la alimentación de IgG policlonal de 4 g/l a 206,8 kPa (30 psi) y la capacidad de producción en volumen se mide y se representa frente al tiempo hasta que el flujo decae al 25 % del flujo de tampón solo inicial. La capacidad de producción total de la solución de IgG policlonal se mide en l/m² a V75 y se convierte en kg de IgG policlonal por m² de membrana.

Tal como se puede observar a partir de la Tabla 1 y la Figura 2, la membrana 3 modificada con AMPS al 1,8 %, acrilamida al 3,0 % proporciona una mayor protección para el filtro de retirada de virus (mayor capacidad de producción en masa) que las otras combinaciones de AMPS y comonómeros. La membrana 3 que contiene acrilamida también proporciona una capacidad de producción en masa más alta que la membrana de control 2 de membrana de base y la membrana 1 de virus no prefiltrada.

Ejemplo 2. Los cambios de permeabilidad en respuesta a la presencia de proteína en la solución son indicativos de la naturaleza tridimensional del recubrimiento de superficie que contiene acrilamida (no de acuerdo con la invención)

Este Ejemplo demuestra la naturaleza de la química de superficie preparada usando acrilamida como comonómero. La permeabilidad de las combinaciones de dispositivos usadas en el Ejemplo 1 se somete a ensayo usando tanto la solución de alimentación que contiene 4 g/l de IgG como la solución de tampón idéntica sin ninguna proteína. Se observa que los dispositivos que contienen acrilamida como comonómero albergan algunas propiedades únicas, ya que la permeabilidad del tren aumenta en presencia de IgG (Tabla 2, Figuras 3 y 4), en comparación con la permeabilidad en el caso de otros prefiltros y el VPro no prefiltrado (membrana 1). Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se formula la hipótesis de que el uso de la acrilamida copolimerizada hidrófila pequeña con el grupo de unión de CEX AMPS en la membrana 3 permite un hidrogel de polímero único (Figura 5), que se puede contraer fácilmente cuando la IgG forma reticulaciones iónicas, lo que abre, por tanto, los poros de membrana y da como resultado el aumento de la permeabilidad.

Las formulaciones más hidrófobas en la Tabla 2 que usan los comonómeros BMA y DMAM (membranas 4, 5 y 9) no tienen el mismo efecto sobre la permeabilidad (Tabla 2, Figuras 3 y 4).

Tabla 2. Permeabilidad de la solución de tampón y proteína de diversas combinaciones de prefiltro/VPro.

<u>N.º de muestra de membrana</u>	<u>Descripción</u>	<u>Tampón (LMH/kPa (psi))</u>	<u>4 g/l de IgG en tampón (LMH/ kPa (psi))</u>
1	Filtro de virus solo	16,0	7,6
2	Membrana de base	14,6	14,0
8	AMPS al 4,8 %, DMAM al 0 %	12,5	11,2
9	AMPS al 1,5 %, BMA al 3,3 %	12,3	11,8
4	AMPS al 1,5 %, DMAM al 3,3 %	8,0	7,4
5	AMPS al 1,8 %, DMAM al 3,0 %	11,4	11,2
3	AMPS al 1,8 %, AM al 3,0 %	6,1	8,3

Ejemplo 3. Capacidad de unión a proteínas en función de la conductividad (no de acuerdo con la invención)

- 5 Este Ejemplo ilustra el efecto único de la acrilamida como comonomero mediante la medición de la capacidad de unión de IgG estática de las membranas modificadas en superficie en la Tabla 3 a pH 4,0 y a diferentes conductividades de solución.

10 Se preparó una alimentación de IgG policlonal para la medición de las capacidades de unión estáticas nueva a 1,0 g/l de IgG usando polvo de gamma globulina humana de SeraCare Life Sciences, (catálogo n.º HS-470-90) a pH 4 y acetato de sodio 10 mM. El pH 4,0 final y las conductividades en la Tabla 3 se realizan usando HCl 10 M, NaOH y NaCl. La solución se filtra estéril antes de su uso.

15 Las muestras de membrana se cortan en radios conocidos usando un troquel circular. El volumen de membrana ($V = \pi r^2 h$) se calcula usando un espesor de membrana de 100 micrómetros. Las muestras de disco de membrana se humedecen previamente con agua y se intercambian en las soluciones de tampón de pH 4,0 adecuadas, según la Tabla 3. Los discos de membrana se colocan posteriormente en el volumen adecuado de 1 g/l de IgG a pH 4,0. Las cargas diana son de aproximadamente 100 mg/ml, en el caso de 2 mS/cm, 50 mg/ml, en el caso de 15 y 25 mS/cm, y 25 mg/ml, en el caso de 37 y 49 mS/cm. Las muestras de membrana y las soluciones de IgG se mezclan en rotación durante 8 horas y el sobrenadante se mide para determinar la concentración final de IgG mediante absorbancia de UV280. Las capacidades de IgG estáticas en mg de IgG por ml de membrana se calculan mediante el equilibrio en masa basándose en las concentraciones finales de sobrenadante. Las capacidades de IgG estáticas de membranas finales en la Tabla 3 y la Figura 6 muestran que las membranas que contienen acrilamida, es decir, las membranas 3 y 17, y que tienen un reticulante de diacrilato de tetra(etilen glicol) que reemplaza MBAM tienen capacidades de IgG

20 estáticas a pH 4 hasta 25 mS/cm más altas que otras membranas sometidas a ensayo (es decir, la membrana de base 2), las membranas con un mayor número de grupos de unión (es decir, las membranas 7 y 8), las membranas sin acrilamida (es decir, las membranas 8, 16, 18) y las membranas con el comonomero DMAM (es decir, las membranas 7, 5, 19).

- 30 La presencia de la acrilamida pequeña, neutra e hidrófila con el grupo de unión de CEX AMPS en las membranas 3 y 17 permite un hidrogel de polímero único que proporciona mayores capacidades de IgG estáticas.

Tabla 3. Capacidades de unión estáticas de IgG de diversas membranas modificadas en superficie de CEX. Las membranas 17-19 tienen un reticulante de diacrilato de tetra(etilen glicol) que reemplaza la N,N'-metilenbisacrilamida en las membranas 3, 5 y 16.

<u>N.º de muestra de membrana</u>	<u>Descripción</u>	<u>Conductividad (mS/cm)</u> <u>Capacidad de IgG estática (mg/ml)</u>				
		<u>2</u>	<u>15</u>	<u>25</u>	<u>37</u>	<u>49</u>
(2)	Membrana de base	5,2	1,7	2,6	0,8	0,7
(8)	AMPS al 4,8 %, DMAM al 0 %	20,6	15,7	9,9	5,2	3,4
(7)	AMPS al 2,4 %, DMAM al 2,4 %	41,0	23,0	10,4	1,6	0,5
(3)	AMPS al 1,8 %, AM al 3,0 %	57,0	34,4	15,7	3,0	1,0
(16)	AMPS al 1,8 %, AM al 0 %	10,5	7,8	6,2	3,2	2,2
(5)	AMPS al 1,8 %, DMAM al 3,0 %	12,3	8,6	4,1	0,9	0,5
(17)	AMPS al 1,8 %, AM al 3,0 % (TEGDA)	30,8	22,9	5,3	1,0	0,5
(18)	AMPS al 1,8 %, AM al 0 % (TEGDA)	11,7	9,2	2,5	2,8	2,3
(19)	AMPS al 1,8 %, DMAM al 3,0 % (TEGDA)	14,3	6,2	3,1	1,2	0,8

Ejemplo 4. Selectividad de las membranas que contienen acrilamida de los agregados de proteínas, tal como se evalúa mediante las mediciones de SEC de las eluciones de unión dinámica de CEX (no de acuerdo con la invención)

Este ejemplo demuestra la selectividad de las membranas que contienen acrilamida de los agregados de IgG.

La capacidad de agregado de CEX dinámica se mide en las membranas en la Tabla 3 para cuantificar las diferencias de selectividad de agregado de las membranas. Se usa una alimentación de IgG policlonal que contiene agregados para proporcionar cargas de CEX dinámicas equivalentes en condiciones de unión a las membranas en la Tabla 3. Las eluciones de CEX después de una carga equivalente se usan para determinar la capacidad de IgG, la selectividad de agregado mediante cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) analítica y la capacidad de agregado de las membranas en la Tabla 4.

Se prepara la alimentación nueva a 10,0 g/l de IgG usando polvo de gamma globulina humana de SeraCare Life Sciences, (catálogo n.º HS-470-90) a pH 4 y acetato de sodio 10 mM a 2,0 mS/cm (usando NaCl). Los ajustes finales de pH y conductividad se realizan usando HCl 10 M, NaOH o NaCl 4 M y la solución se filtra estéril antes de su uso.

Los dispositivos de microfiltración con áreas de filtración de 3,1 cm² se moldean previamente usando 3 capas de membrana. Los dispositivos se humedecen previamente y se lavan con 20 ml de solución de tampón, a pH 4, acetato 10 mM, 2 mS/cm y, a continuación, 40 ml de 10 g/l de IgG (carga de 4,0 kg/l o 1,3 kg/m²) se hacen fluir a través de dispositivos individuales a 0,2 ml/min (2 VC/min). Los dispositivos se lavan con 2 ml (20 VC) de tampón y se eluyen con 2 ml (20 VC) de NaCl 0,5 M a pH 4.

Las eluciones se analizan en especies de peso molecular usando cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) analítica. El porcentaje de agregados determinado a partir de las integraciones de los cromatogramas SEC y las capacidades de unión de IgG (a partir de las concentraciones de elución a UV280) se usan para calcular las capacidades de agregado de las membranas en la Tabla 4 y las Figuras 7 y 8.

La Figura 9 es un cromatograma representativo de una superposición mediante SEC-HPLC normalizada que incluye la solución de carga de alimentación y las eluciones de las membranas 3, 16, 5 y 8 de la Tabla 4. La superposición muestra que la retirada por elución de la membrana 3 que contiene acrilamida tiene un porcentaje de agregados más alto que las membranas 8 y 16 sin un comonomero neutro o la membrana 5 con el comonomero DMAM. Este resultado demuestra que la presencia de acrilamida mejora la selectividad de la membrana de los agregados.

Las capacidades de agregado en la Tabla 4 y las Figuras 7 y 8 son las más altas en las membranas 3 y 17 que contienen acrilamida (con un reticulante de diacrilato de tetra(etilen glicol) que reemplaza MBAM). Las membranas que contienen acrilamida tienen capacidades de agregado más altas que la membrana de base 2, las membranas con un mayor número de grupos de unión (las membranas 8 y 7), las membranas sin acrilamida (las membranas 8, 16, 18), así como las membranas con DMAM (las membranas 7, 5, 19).

La Figura 8 demuestra que las membranas con capacidades de agregado más altas tienden a proporcionar una mejor protección de Viresolve® Pro, lo que produce, de ese modo, capacidades de producción en masa de IgG más altas usando el proceso del Ejemplo 1.

Tabla 4. Capacidades de unión de agregado de IgG de diversas membranas modificadas en superficie con CEX.

<u>N.º de muestra de membrana</u>	<u>Descripción</u>	<u>Capacidad de agregado (mg/ml)</u>	<u>Capacidad de producción en masa a V75 (kg/m²)</u>
(2)	Membrana de base	2,6	0,53
(8)	AMPS al 4,8 %, DMAM al 0 %	5,8	0,33
(7)	AMPS al 2,4 %, DMAM al 2,4 %	9,4	0,60
(3)	AMPS al 1,8 %, AM al 3,0 %	10,3	0,71
(16)	AMPS al 1,8 %, AM al 0 %	3,7	0,42
(5)	AMPS al 1,8 %, DMAM al 3,0 %	3,7	0,56
(17)	AMPS al 1,8 %, AM al 3,0 % (TEGDA)	12,0	1,19
(18)	AMPS al 1,8 %, AM al 0 % (TEGDA)	3,5	0,34
(19)	AMPS al 1,8 %, DMAM al 3,0 % (TEGDA)	4,2	0,54

Ejemplo 5. Preparación y ensayo de prefiltros hidrófobos que contienen acrilamida en comparación con prefiltros sin acrilamida

Este ejemplo demuestra los beneficios del uso de la acrilamida como comonomero con un grupo de unión hidrófobo para la protección de un filtro de virus en condiciones de unión hidrófobas (pH neutro a más alto y conductividad moderada a alta).

El monómero hidrófobo N-bencilacrilamida, al 2,5 % en peso (Alfa Aesar L11450), se usa como grupo de unión y se copolimeriza con el 2,0 % en peso de acrilamida y el reticulante N,N'-metilenbisacrilamida (0,8 % en peso). Los

monómeros se disuelven en agua:MPD a 50:50 ((±)-2-metil-2,4-pentanodiol), se sumerge una lámina de 14x14 cm de membrana de poliétersulfona (PES) hidrófila calibrada de 0,22 micrómetros en la solución durante 30 segundos y se retira el exceso de solución. La polimerización se inicia usando haz de electrones (2,5 MRad a 170 kV) y la membrana se enjuaga posteriormente con agua desionizada y se seca al aire. Las membranas de prefiltro con un grupo de unión hidrófobo con y sin el comonomero de acrilamida se evalúan para determinar su rendimiento de prefiltración para mejorar la capacidad de producción de un filtro de virus aguas abajo. La corriente de alimentación contiene agregados de IgG policlonal que generalmente obstruyen rápidamente el filtro de virus no prefiltrado (Ejemplo 1). Dado que el grupo de unión es hidrófobo, su efecto con y sin acrilamida se evalúa en condiciones de solución de pH neutro a más alto y conductividad moderada a alta, que generalmente potencian las interacciones hidrófobas de los anticuerpos.

Se prepara una alimentación de IgG policlonal nueva a 0,5 o 2,0 g/l de IgG con polvo de gamma globulina humana de SeraCare Life Sciences, (catálogo n.º HS-470-90) a pH 7,0, 5 mS/cm, pH 7,5, 15 mS/cm y pH 6,0, 25 mS/cm usando tampón de Tris y NaCl (Tabla 5). Los ajustes finales de pH y conductividad se realizan usando HCl 10 M, NaOH o NaCl 4 M y la solución se filtra estéril antes de su uso.

Los dispositivos de microfiltración con áreas de filtración de 3,1 cm² se moldean previamente usando 3 capas de membrana y se ponen en serie a una relación de área de 1:1 con los dispositivos Viresolve® Pro Micro (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA). Ambos dispositivos se humedecen previamente y ventilan para retirar el aire usando una solución de tampón. A presión constante de 206,8 kPa (30 psi), se mide el flujo inicial en ml/min en masa durante un período de 20 minutos para determinar el valor de flujo constante inicial. La alimentación se cambia a la solución de IgG policlonal a 206,8 kPa (30 psi) y la capacidad de producción en volumen se mide y se representa frente al tiempo hasta que el flujo decae al 25 % del flujo de tampón inicial. La capacidad de producción total de la solución de IgG policlonal se mide en l/m² a V75 y se convierte en kg de IgG policlonal por m² de membrana. Tal como se puede observar a partir de la Tabla 5 y las Figuras 10, 11 y 12, las membranas 3 y 4 modificadas con BAM al 2,5 %, acrilamida al 1,0 o 2,0 % proporcionan una mayor protección del filtro de retirada de virus (mayor capacidad de producción en masa) que las membranas 5, 6, 7 u 8 que no contenían acrilamida. Las membranas 3 y 4 que contienen acrilamida también proporcionan una capacidad de producción en masa similar al prefiltro Viresolve® (mecanismo principalmente hidrófobo) y una capacidad de producción mucho mejor que el protector Viresolve® (mecanismo de CEX) en las 3 condiciones de solución.

Tabla 5. Formulación y rendimiento de prefiltros hidrófobos que contienen acrilamida en comparación con prefiltros comerciales actualmente disponibles y prefiltros sin acrilamida.

N.º de muestra de membrana	Descripción	N-bencilacrilamida (% en peso)	Acrilamida (% en peso)	% de MBAM	Capacidad de producción en masa a V75 (kg/m ²)		
					pH 7,0, 5 mS/cm	pH 7,5, 15 mS/cm	pH 6,0, 25 mS/cm
(1)	Protector Viresolve	ND	ND	ND	0,24	0,09	0,12
(2)	Prefiltro Viresolve	ND	ND	ND	0,71	0,51	0,48
(3)	BAM al 2,5 %, AM al 2,0 %	2,5	2,0	0,8	0,63	0,39	0,46
(4)	BAM al 2,5 %, AM al 1,0 %	2,5	1,0	0,8		0,39	0,48
(5)	BAM al 2,0 %	2,0	0	0,8	0,19	0,21	0,24
(6)	BAM al 3,0 %	3,0	0	0,8	0,23	0,19	0,16
(7)	BAM al 5,0 %	5,0	0	0,8			0,19
(8)	BAM al 2,5 %, MBAM al 3,0 %	2,5	0	3,0	0,32		

Ejemplo 6. Comparación de prefiltro hidrófobo que contiene acrilamida con prefiltros comerciales y membranas de base no modificadas usando IgG policlonal

Este Ejemplo demuestra que la membrana (3) del Ejemplo 5 (Tabla 5) con la química de modificación de superficie del ligando de unión hidrófobo N-bencilacrilamida (BAM) y acrilamida (AM) protege un filtro de virus en condiciones de unión hidrófobas (pH neutro a más alto y conductividad moderada a alta). Tal como se observa, la membrana (3) mejora la capacidad de producción en masa de IgG policlonal de un filtro de virus aguas abajo (Viresolve® Pro, EMD Millipore Corp., Billerica, MA) mejor que los prefiltros disponibles en el mercado y las membranas de polímero base no modificadas.

Los prefiltros de la Tabla 6 se evaluaron para determinar su rendimiento de prefiltración para mejorar la capacidad de producción en masa de IgG policlonal de un filtro de virus aguas abajo. La muestra de membrana (1) es el protector Viresolve®, un filtro de membrana con una modificación de superficie que se basa en un mecanismo de CEX

(VPMSKITNB9, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA). La muestra (2) es el prefiltro OptiScale-40 Viresolve®, un filtro de profundidad que se basa en un mecanismo hidrófobo (SSPVA40NM9, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) con un área de filtración de 5 cm².

La membrana (4) es una membrana de poliétersulfona (PES) hidrofílica de 0,2 mm (calidad de esterilización exprés, GEPP, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) con un espesor de 110 mm. La membrana (5) es una membrana hidrófila de nailon (poliamida) de 0,20 mm (GNWP, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) con un espesor de 170 mm. La membrana (6) es una membrana de poliétersulfona (PES) no modificada de 0,2 mm (GEHP, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) con un espesor de 110 mm.

La corriente de alimentación contiene agregados de IgG policlonal que obstruyen rápidamente el filtro de virus no prefiltrado (Ejemplo 1). Dado que el grupo de unión de la membrana (3) es hidrófobo, su rendimiento de prefiltración se evaluó en condiciones de solución que generalmente potencian las interacciones hidrófobas de los anticuerpos: pH neutro a más alto y conductividad moderada a alta.

Se prepara una alimentación de IgG policlonal nueva a 2,0 g/l de IgG con polvo de gamma globulina humana de SeraCare Life Sciences, (catálogo n.º HS-470-90) a pH 6,0, 25 mS/cm, usando tampón de acetato y NaCl. Los ajustes finales de pH y conductividad se realizan usando HCl 10 M, NaOH o NaCl 4 M y la solución se filtra estéril antes de su uso.

Los dispositivos de microfiltración con áreas de filtración de 3,1 cm² se moldearon previamente usando 2 o 3 capas de membrana para obtener espesores equivalentes o un volumen total y se pusieron en serie a una relación de área de 1:1 con los dispositivos de filtración de virus Viresolve® Pro Micro (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA). Ambos dispositivos se humedecieron previamente y ventilaron para retirar el aire usando una solución de tampón. A presión constante de 206,8 kPa (30 psi), se midió el flujo inicial de tampón solo en ml/min en masa durante un período de 20 minutos para determinar el valor de flujo constante inicial. La alimentación se cambió a la IgG policlonal en solución de tampón a 206,8 kPa (30 psi) y el la capacidad de producción en volumen se midió y se representó frente al tiempo hasta que el flujo decayó al 25 % y al 10 % del flujo de tampón inicial. La capacidad de producción total de la solución de IgG policlonal se midió en l/m² a V75 y V90 y se convirtió en kg de IgG policlonal por m² de membrana.

Tal como se puede observar en la Tabla 6 y la Figura 13, la membrana (3) modificada con BAM al 2,5 %, acrilamida al 2,0 %, MBAM al 0,8 % proporcionó una mayor protección del filtro de retirada de virus (mayor capacidad de producción en masa de IgG policlonal) que los filtros de membrana comerciales (1) y (4), así como las membranas (5) y (6) de polímero de base no modificadas. Esto demostró que la modificación en superficie usando el copolímero BAM de ligando hidrófobo con acrilamida protegía mejor en las condiciones de unión hidrófobas típicas (pH 6, 25 mS/cm) que los filtros de membrana (1) comerciales, el mecanismo de CEX y (4), la PES hidrofílica, así como las membranas no modificadas compuestas de poliamida (5) y poliétersulfona (6). La membrana (3) proporcionó una mayor capacidad de producción en masa a la muestra (2) del prefiltro Viresolve® (EMD Millipore Corp., Billerica, MA) cuando se normalizó a 3,1 cm², que se sabe que adsorbe proteínas principalmente a través de un mecanismo hidrófobo.

Tabla 6. Prefiltro hidrófobo que contiene acrilamida en comparación con prefiltros comerciales actualmente disponibles y membranas de base no modificadas

					Capacidad de producción en masa (kg/m²)	
N.º de muestra de membrana	Descripción	N-bencilacrilamida (% en peso)	Acrilamida (% en peso)	% de MBAM	V75	V90
(1)	Protector Viresolve	ND	ND	ND	0,05	0,05
(2)	Prefiltro Viresolve	ND	ND	ND	0,50	0,54
(3)	BAM al 2,5 %, AM al 2,0 %	2,5	2,0	0,8	0,63	0,74
(4)	Membrana de calidad esterilizante de 0,2 mm (poliétersulfona, PES, hidrofílica)	ND	ND	ND	0,08	0,10
(5)	Membrana de poliamida de 0,2 mm	ND	ND	ND	0,36	0,40
(6)	Membrana de poliéter sulfona (PES) de 0,2 mm	ND	ND	ND	0,13	0,14

Ejemplo 7. Rendimiento del prefiltro hidrófobo que contiene acrilamida con anticuerpos monoclonales

- Este Ejemplo demuestra que la membrana (3) del Ejemplo 6 (Tabla 6) con la química de modificación en superficie del ligando de unión hidrófobo N-bencilacrilamida (BAM) con acrilamida (AM) protege un filtro de virus (Viresolve® Pro, EMD Millipore Corp., Billerica, MA) en condiciones de unión hidrófobas para mejorar la capacidad de producción en masa de anticuerpos monoclonales (MAb). Estos Ejemplos demostraron que el prefiltrado del filtro de virus con la membrana (3) funcionó mejor que la filtración de virus sin prefiltración, que usaba un prefiltro de membrana no modificada compuesto de poliamida (5) o una membrana de PES hidrofílica (4).
- Los prefiltros de membrana (3), (4) y (5) en la Tabla 7 se evaluaron para determinar su rendimiento de prefiltración para mejorar la capacidad de producción en masa de anticuerpos monoclonales (MAb) con un filtro de virus aguas abajo (Viresolve® Pro, EMD Millipore Corp., Billerica, MA) en condiciones de unión hidrófobas (pH neutro a más alto y conductividad moderada a alta).
- La membrana (4) es una membrana de polietersulfona (PES) hidrofílica de 0,2 mm (calidad de esterilización expres, GEPP, EMD Millipore Corp., Billerica, MA) con un espesor de 110 mm. La membrana (5) es una membrana hidrófila de nailon (poliamida) de 0,20 mm (GNWP, EMD Millipore Corp., Billerica, MA) con un espesor de 170 mm.
- Las especificaciones de las corrientes de alimentación de MAb MAb 01, 05 y 07 y las condiciones y los resultados del experimento de capacidad de filtración se detallan en la Tabla 7, Figuras 14-16. Los tres MAb se purificaron a un estado de al menos la elución de la proteína A posterior y las condiciones de solución se ajustaron a las condiciones de la Tabla 7 usando HCl 10 M, NaOH o NaCl 4 M.
- Los soportes de filtro Swinney de 13 mm de diámetro de acero inoxidable con un área de filtración de 0,8 cm² (XX3001200, EMD Millipore Corp., Billerica, MA) se ensamblaron usando 2 o 3 capas de la membrana de prefiltración (3), (4) y (5) para obtener espesores equivalentes o un volumen total y se pusieron en serie a una relación de área de 1:1 usando el mismo soporte con 2 capas de membrana de filtración de virus Viresolve® Pro (EMD Millipore Corp., Billerica, MA).
- Los dispositivos de prefiltro y membrana de virus se humedecieron previamente con tampón a 206,8 kPa (30 psi) y se transfirieron a las alimentaciones de anticuerpos monoclonales para el ensayo. Los experimentos de capacidad se realizaron a un flujo constante de 166 LMH (l/m².h) y se controló la presión en el lado aguas arriba de la filtración para detectar el taponamiento de los trenes de filtración. La capacidad de producción total de las soluciones de MAb se midió en volumen y se convirtió en kg de MAb por m² de membrana de virus.
- Los tres Ejemplos que usaban tres MAb diferentes se encontraban en condiciones de unión hidrófobas más favorables (pH neutro a más alto y conductividad moderada a alta), cerca de los puntos isoeléctricos de los MAb y/o las conductividades de solución moderadas.
- La Figura 14 muestra que la membrana (3) es eficaz para reducir el aumento de presión, en comparación con el VPro no prefiltrado. La Figura 15 muestra que la membrana (3) protege el VPro para mejorar la capacidad de producción en masa 4x de MAb 05, en comparación con el VPro no prefiltrado. La Figura 16 muestra que la membrana (3) de MAb 07 funcionó mejor que la filtración de virus de VPro sin prefiltración y los prefiltros de membrana no modificada compuestos de poliamida (5) y el filtro de membrana de calidad esterilizante comercial (4).

Tabla 7. Rendimiento de filtración de virus de anticuerpos monoclonales usando prefiltro hidrófobo que contiene acrilamida (3) en comparación con membranas comerciales

<u>N.º de Figura</u>	<u>MAB</u>	<u>Concentración (g/l)</u>	<u>Agregados mediante SEC-HPLC (%)</u>	<u>pH</u>	<u>Conductividad (mS/cm)</u>		<u>Prefiltro</u>	<u>Capacidad de producción en masa a 206.8 kPa (30 psi) (kg/m²)</u>
13	01	15,3	0,8	7,0	4,2		(3) BAM al 2,5 %, AM al 2,0 %	>7,5
							Ninguno (VPro solo)	>7,5
14	05	9,2	0,4	7,5	18,0		(3) BAM al 2,5 %, AM al 2,0 %	1,2
							Ninguno (VPro solo)	0,3
15	07	7,0	4,0	8,0	8,0		(3) BAM al 2,5 %, AM al 2,0 %	>3,1
							Ninguno (VPro solo)	1,0
							(5) Membrana de poliamida de 0,2 mm	2,9
							(4) Membrana de poliéter sulfona (PES) de 0,2 mm (hidrofilizada)	1,6

En resumen, las químicas de membrana recientemente descubiertas permiten mejoras significativas en el rendimiento de los prefiltros para la protección de los filtros de virus.

5 Las realizaciones dentro de la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de las realizaciones y no se deben interpretar como limitantes en su alcance. El experto en la materia reconoce fácilmente que la presente divulgación abarca muchas otras realizaciones.

10 A menos que se indique de otro modo, todos los números que expresan las cantidades de ingredientes, el cultivo de células, las condiciones de tratamiento y así sucesivamente, que se usan en la memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones, se han de entender como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario de otro modo, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan obtener mediante las realizaciones desveladas en el presente documento. A menos que se indique de otro modo, se ha de entender que la expresión "al menos" precediendo a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie. Aquellos expertos en la materia
15 reconocerán o podrán determinar, usando únicamente la experimentación de rutina, muchos equivalentes de las realizaciones específicas descritas en el presente documento.

20 Se pueden realizar muchas modificaciones y variaciones de las realizaciones desveladas en el presente documento, tal como resultará evidente para aquellos expertos en la materia. Las realizaciones específicas descritas en el presente documento se ofrecen únicamente a modo de ejemplo y no se pretende que sean limitantes de ninguna manera. Se pretende que la memoria descriptiva y los Ejemplos se consideren únicamente de ejemplo.

REIVINDICACIONES

1. Un método de separación de una proteína monomérica de interés de los agregados de proteínas en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con una membrana porosa que comprende un copolímero de acrilamida de bencilo y acrilamida, en donde la membrana se une selectivamente a los agregados de proteínas, separando, de ese modo, la proteína monomérica de interés de los agregados de proteínas.
5
2. El método de la reivindicación 1, en donde el método se realiza a un pH de 6 o mayor.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, en donde el método se realiza en una solución de conductividad moderada a alta de 5 mS/cm o mayor.
4. El método de la reivindicación 1, en donde los agregados de proteínas se seleccionan del grupo que consiste en dímeros, trímeros y tetrameros.
15
5. El método de la reivindicación 1, en donde los agregados de proteínas son pentámeros y superiores.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la proteína monomérica de interés es un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal o policlonal, o una proteína recombinante.
20
7. El método de la reivindicación 1, en donde la proteína monomérica de interés se somete adicionalmente a filtración a través de un filtro de retención de virus.

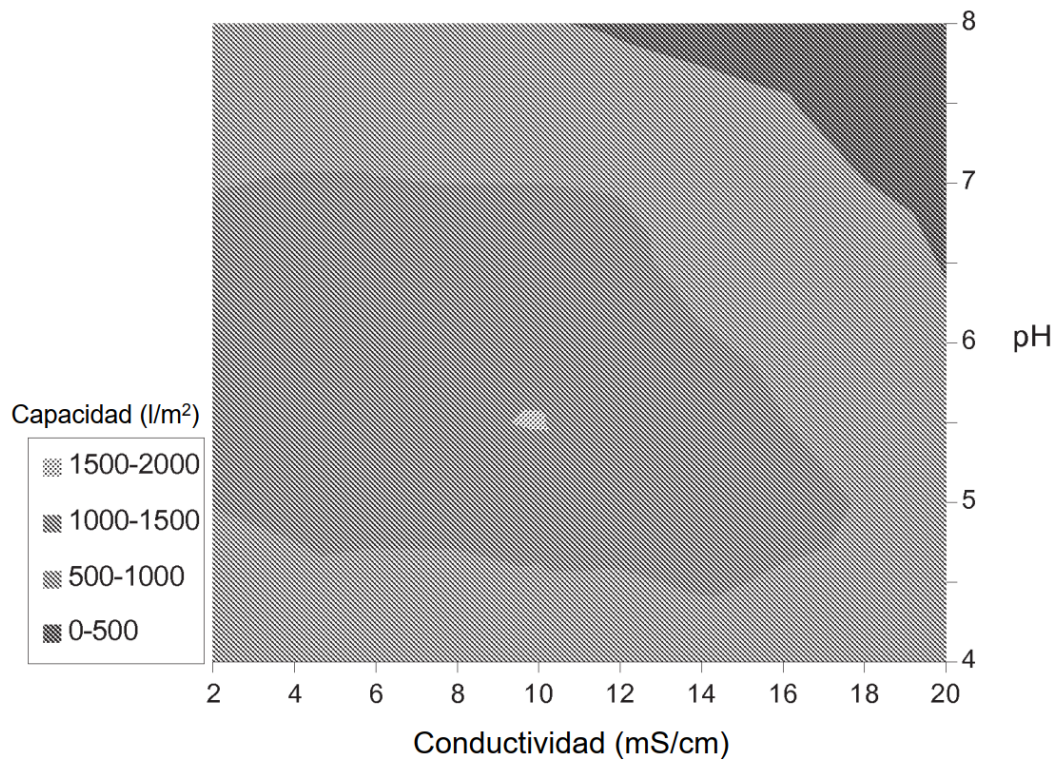


Figura 1. Capacidad de producción de un filtro de virus Viresolve® Pro que usa un protector de prefiltro cargado negativamente Viresolve® Pro usando soluciones de alimentación a diferentes valores de pH y conductividad.

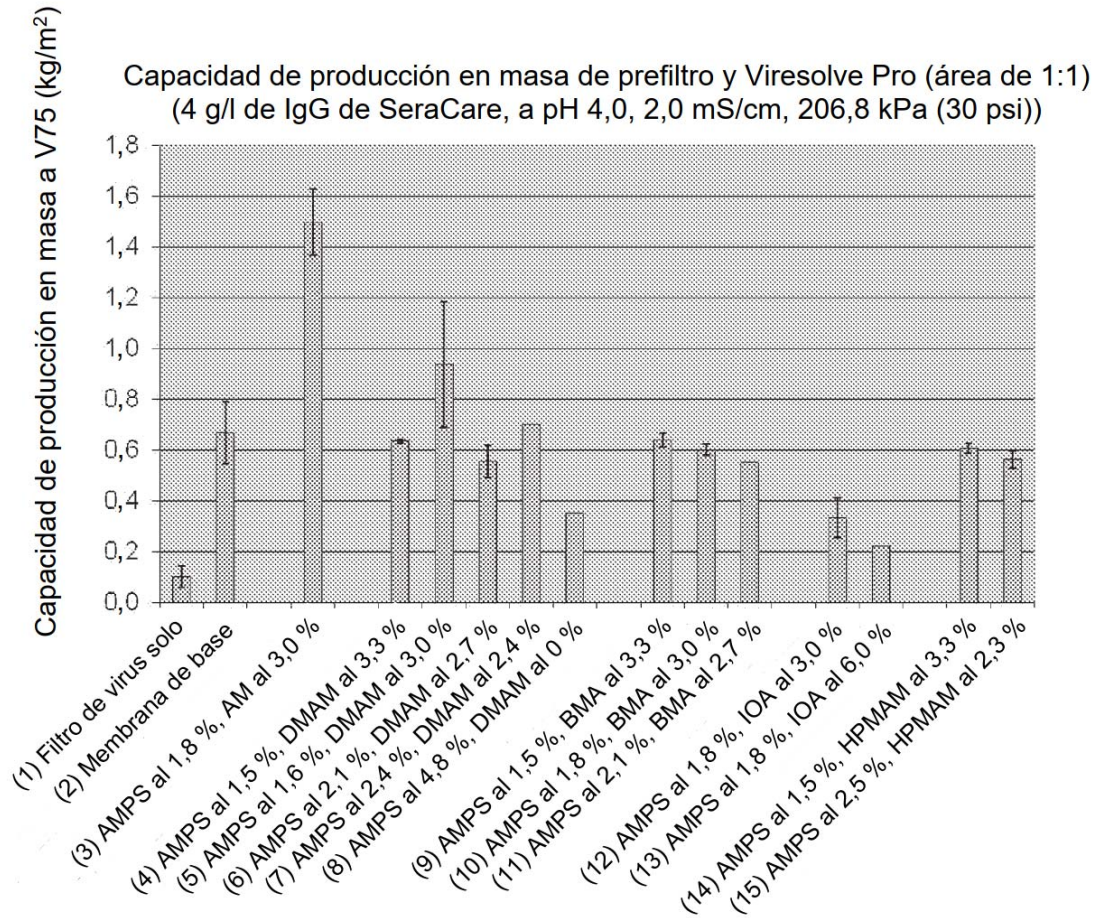


Figura 2. Capacidades de producción en masa de Viresolve Pro (VPro) usando nuevas membranas de adsorción como prefiltros.

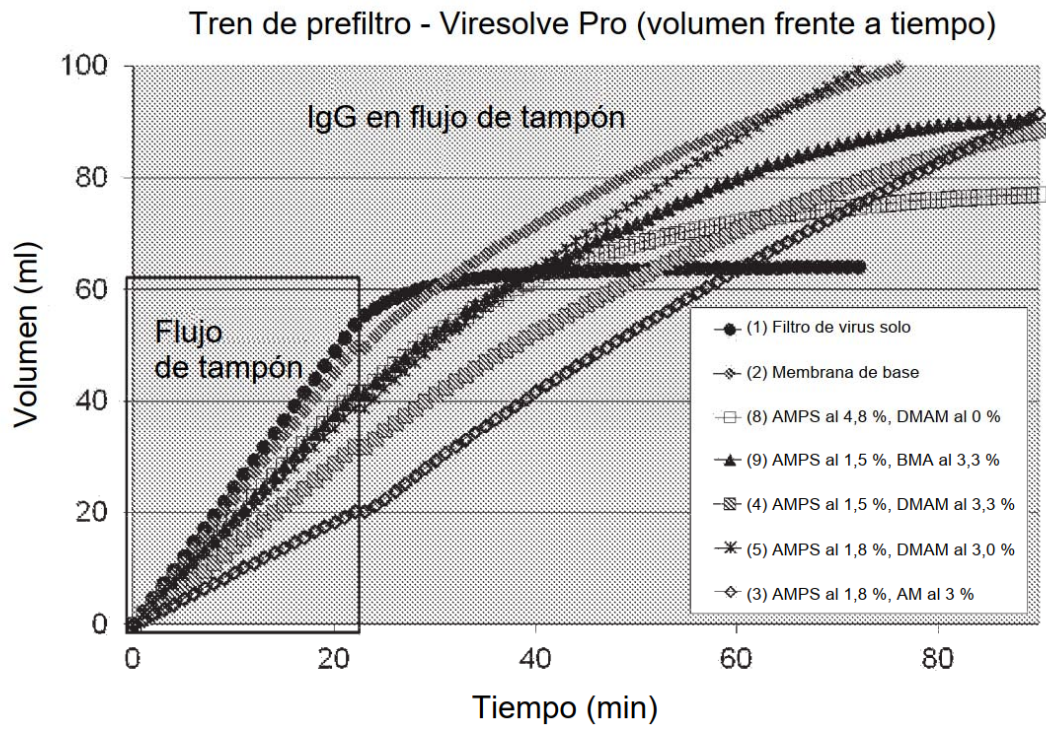


Figura 3. Curvas de volumen frente a tiempo de soluciones de tampón y proteínas en diversas combinaciones de prefiltro/VPro. Las pendientes de las curvas corresponden a las permeabilidades.

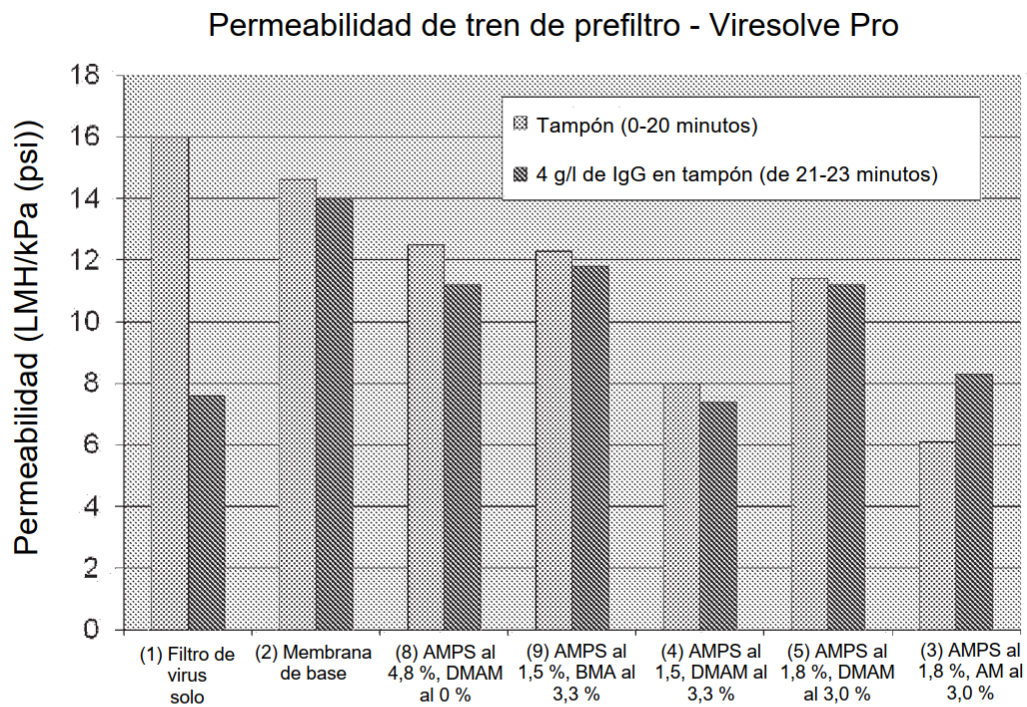


Figura 4. Cambios de permeabilidad de las soluciones de tampón y proteínas de diversas combinaciones de prefiltro/VPro.

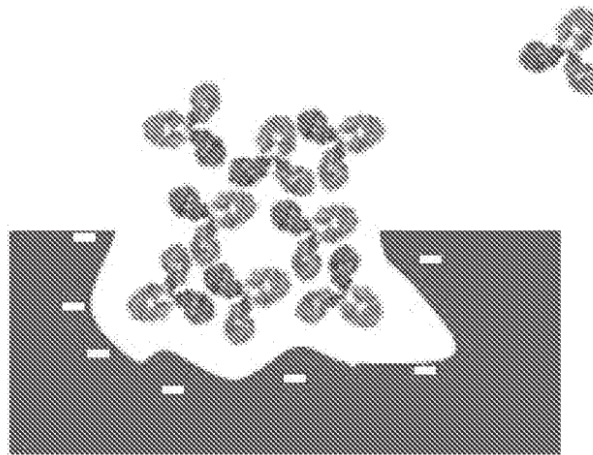


Figura 5. Ilustración de un posible mecanismo de interacción de agregado de IgG con la superficie de membrana que contiene acrilamida.

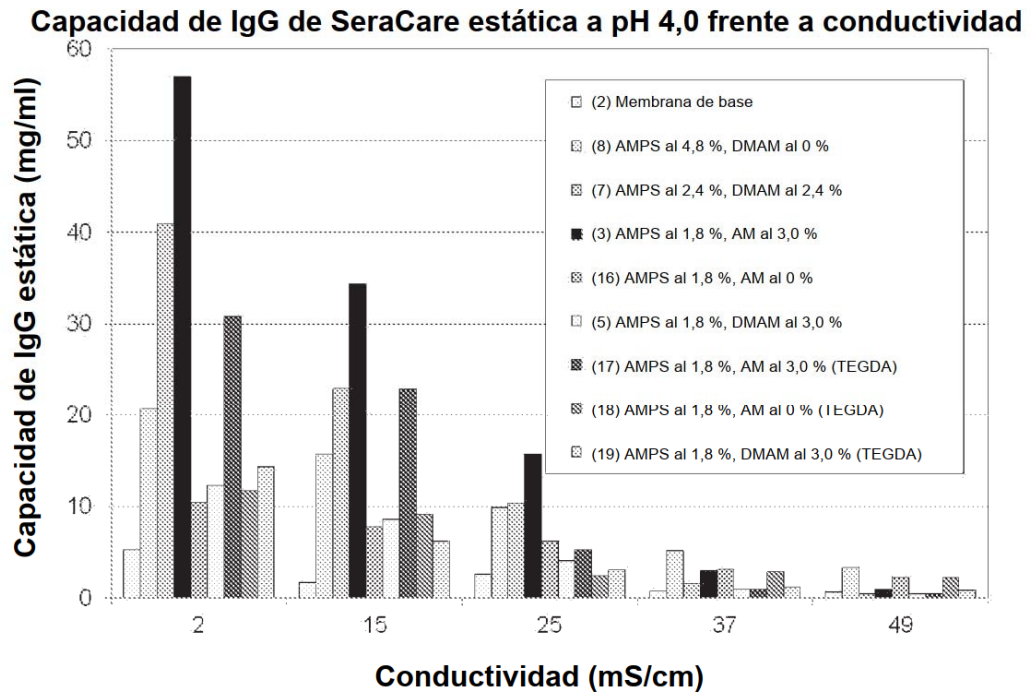


Figura 6. Capacidades de unión estáticas de IgG de diversas membranas modificadas en superficie con CEX.

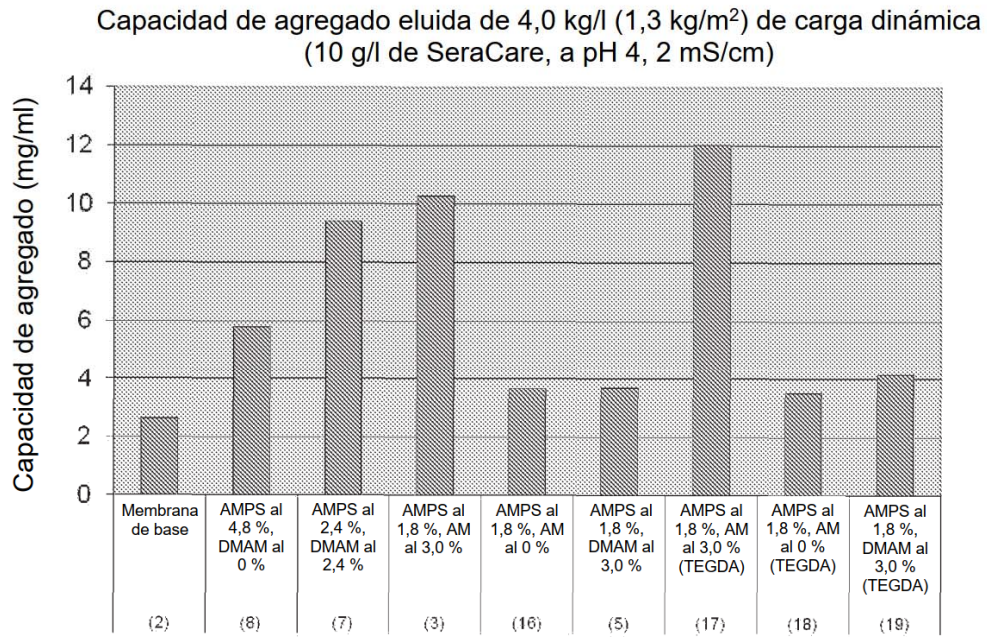


Figura 7. Capacidades de unión de agregado de IgG de diversas membranas modificadas en superficie con CEX.

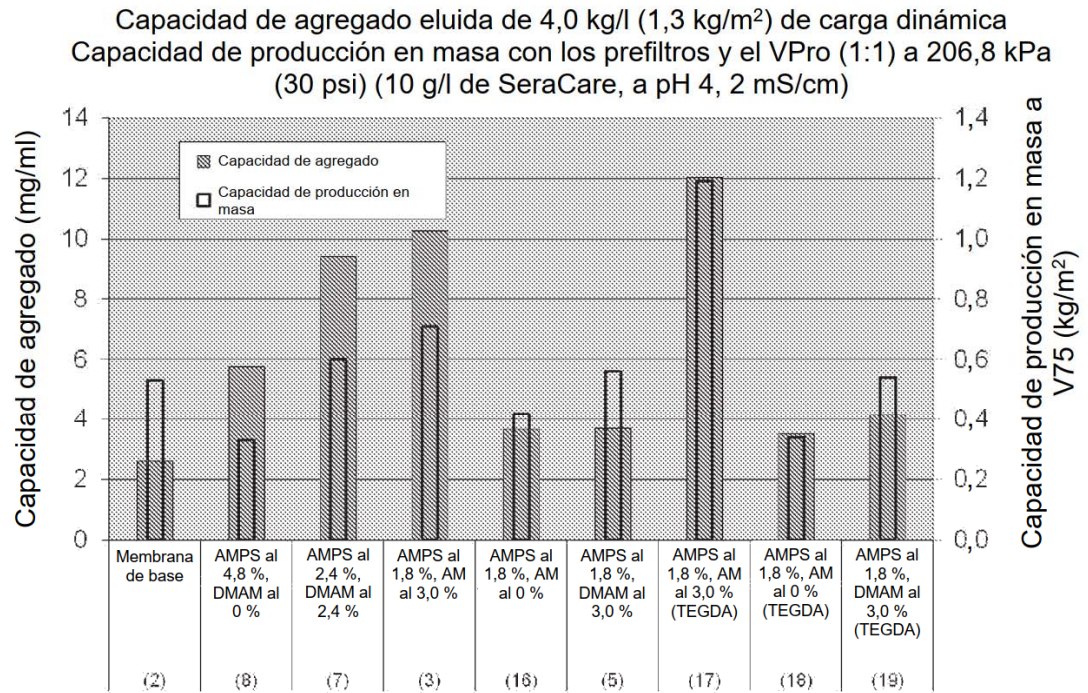


Figura 8. Capacidades de unión de agregado de IgG de diversas membranas modificadas en superficie con CEX y capacidad de producción de VPro correspondiente.

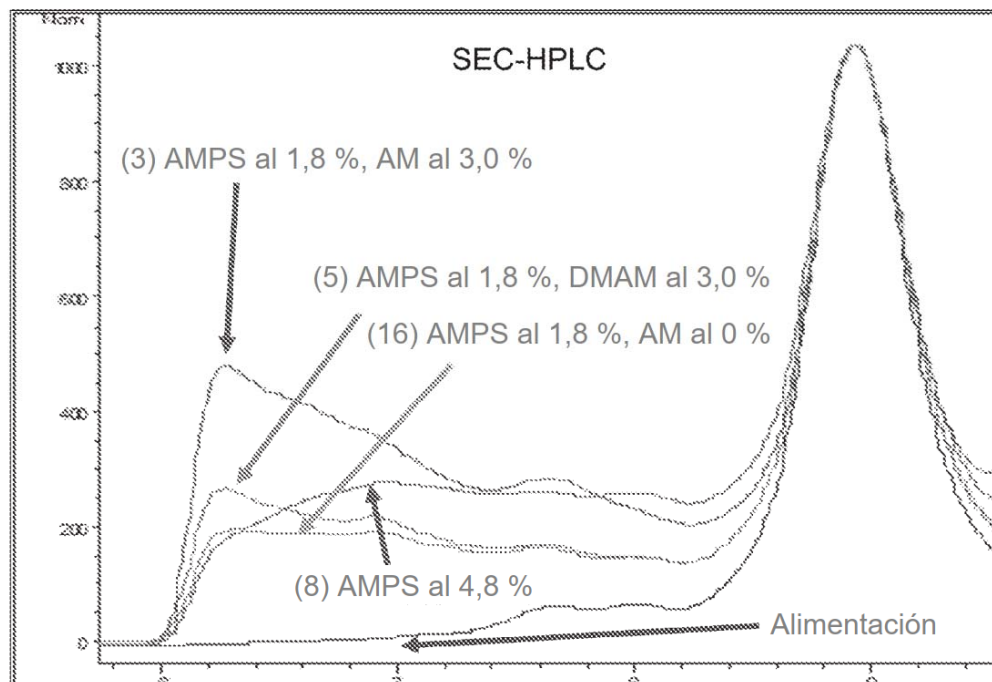


Figura 9. Cromatogramas de SEC de las muestras de IgG de elución de diversas membranas modificadas en superficie con CEX.

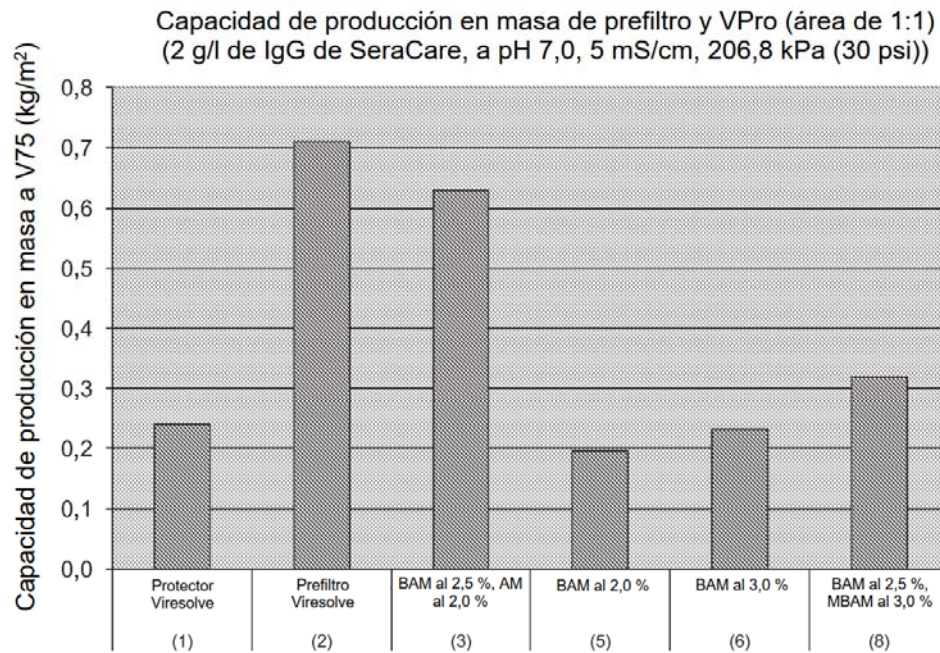


Figura 10. Rendimiento de los prefiltros hidrófobos que contienen acrilamida en comparación con los prefiltros comerciales actualmente disponibles y los prefiltros sin acrilamida a pH 7,0, 5 mS/cm.

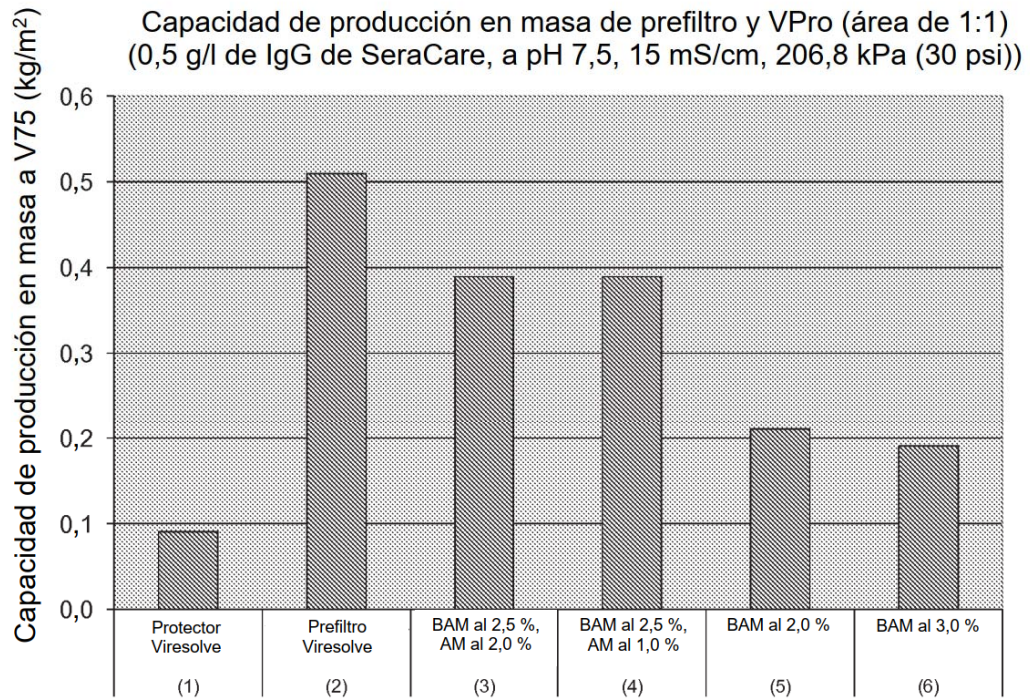


Figura 11. Rendimiento de los prefiltros hidrófobos que contienen acrilamida en comparación con los prefiltros comerciales actualmente disponibles y los prefiltros sin acrilamida a pH 7,5, 15 mS/cm.

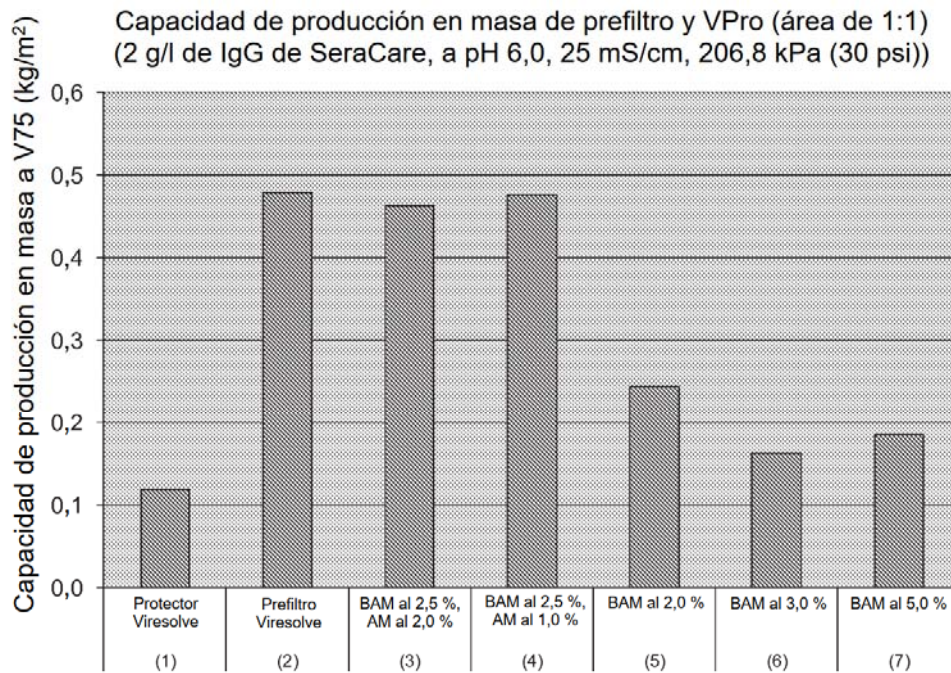


Figura 12. Rendimiento de los prefiltros hidrófobos que contienen acrilamida en comparación con los prefiltros comerciales actualmente disponibles y los prefiltros sin acrilamida a pH 6,0, 25 mS/cm.

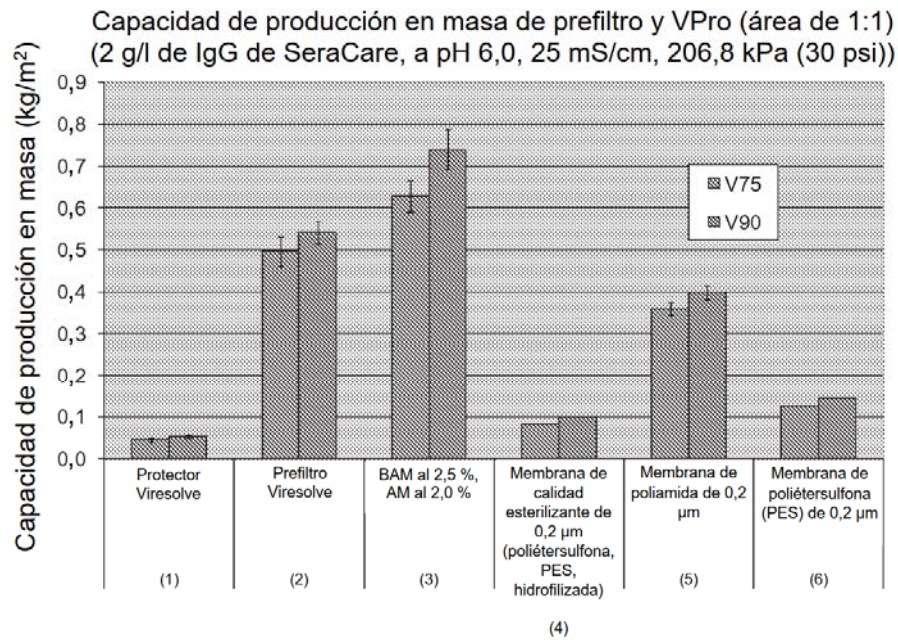


Figura 13. Rendimiento del prefiltro hidrófobo que contiene acrilamida en comparación con los prefiltros comerciales actualmente disponibles y las membranas de base no modificadas a pH 6,0, 25 mS/cm.

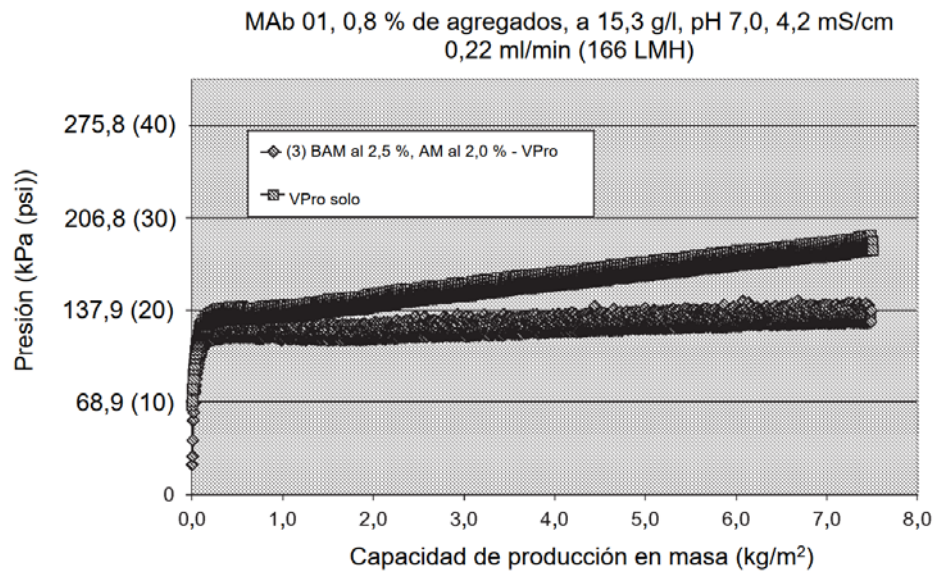


Figura 14. Rendimiento de filtración de virus de MAb 01 con la membrana (3) y sin prefiltración

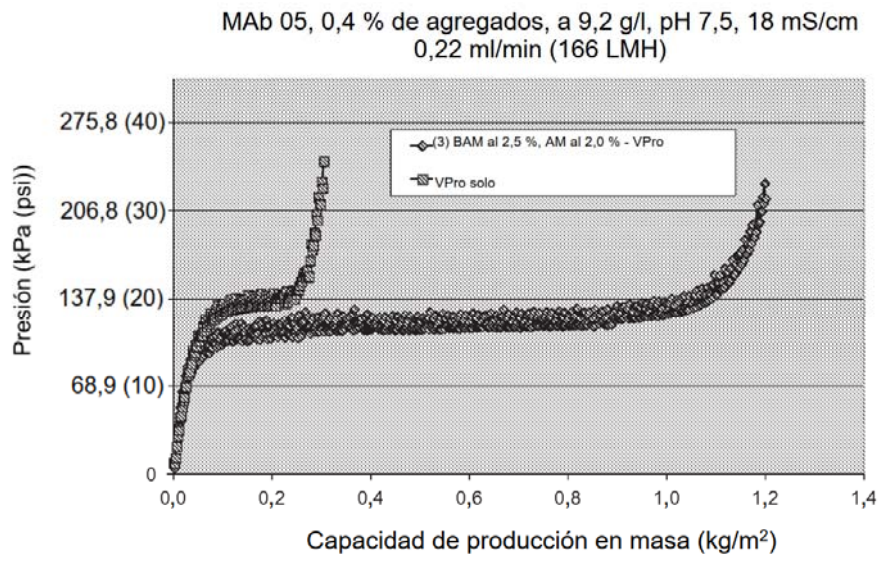


Figura 15. Rendimiento de filtración de virus de MAB 05 con la membrana (3) y sin prefiltración

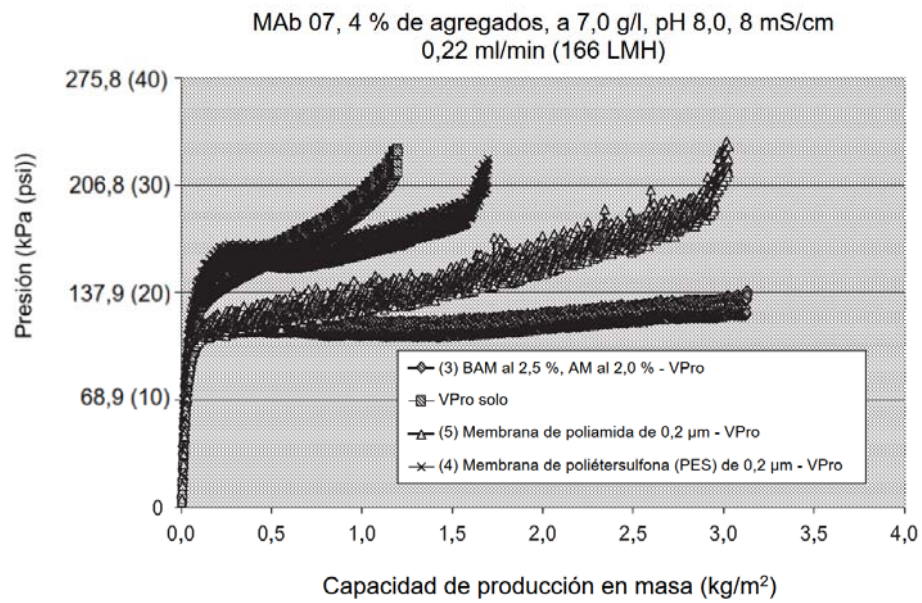


Figura 16. Rendimiento de filtración de virus de MAb 07 con las membranas (3), (4), (5) y sin prefiltración