

República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019007835-5 A2



(22) Data do Depósito: 19/10/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 26/04/2018

(54) Título: VALIDAÇÃO DA DEPURAÇÃO VIRAL CONTÍNUA

(51) Int. Cl.: C12Q 1/22; G01N 33/569; C07K 1/16; A61L 2/00; C12N 7/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 21/10/2016 EP 16194959.9.

(71) Depositante(es): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

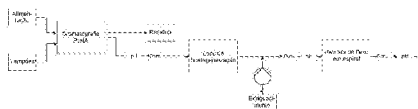
(72) Inventor(es): BENJAMIN MAISER; PETER SCHWAN; LAURA DAVID; MARTIN LOBEDANN.

(86) Pedido PCT: PCT US2017057298 de 19/10/2017

(87) Publicação PCT: WO 2018/075716 de 26/04/2018

(85) Data da Fase Nacional: 17/04/2019

(57) Resumo: VALIDAÇÃO DA DEPURAÇÃO VIRAL CONTÍNUA. A presente invenção refere-se a um método para a validação de depuração viral contínua compreendendo as etapas de provisão de uma sonda a ser validada, enriquecimento da amostra de uma maneira válida, realização da depuração viral, amostragem da sonda enriquecida e análise da amostra da sonda enriquecida da etapa d).



VALIDAÇÃO DA DEPURACÃO VIRAL CONTÍNUA

O processamento contínuo para a produção de proteínas terapêuticas ganha mais e mais importância e as primeiras soluções para a realização de sistemas verdadeiramente contínuos estão emergindo. Uma parte essencial de um processo contínuo para a produção de proteínas terapêuticas é a inativação viral. Klutz et al. introduziram o inversor de fluxo em espiral (CFI) como uma ferramenta para a inativação viral contínua com baixo pH (Klutz, S. et al. 2015, *Journal of Biotechnology* 213, pp. 120 - 130). Ele oferece distribuições do tempo de permanência limitadas e definidas para adaptar o conceito de lote para os processos contínuos (Klutz, S. et al. (2015) *Chemical Engineering Research and Design* 95, pp. 22 - 33). Adicionalmente, os processos contínuos para a produção de proteína terapêutica que permitem o uso de tecnologia de uso único são especialmente interessantes.

No entanto, a fim de usar o processamento contínuo para a produção de proteínas terapêuticas de acordo com as diretrizes e normas tais como GMP (diretriz tripartite harmonizada da ICH), a FDA (diretriz CBER, 2/28/1997) e a EMEA (diretriz CPMP/BWP/268/95, 1996 ou diretriz EMEA/CHMP/BWP/398498, 2009), não apenas precisa ser assegurado que qualquer contaminação viral seja removida de modo confiável, mas isso também tem que ser demonstrado.

Consequentemente, o teste de depuração viral é exigido por autoridades reguladoras para a submissão de nova droga investigacional (IND) e ele é especialmente crítico no desenvolvimento do processo para anticorpos *inter alia* (monoclonais), proteínas recombinantes e glicoproteínas assim como produtos derivados de tecido e sangue.

Em outras palavras, a depuração viral eficaz é mandatória para todos os processos de produção

biofarmacêutica para garantir a segurança dos pacientes. Para a produção de anticorpos monoclonais (mAb), por exemplo, duas etapas de depuração viral dedicadas ortogonais são necessárias. Cada etapa tem que alcançar um valor de redução de log (LRV) ≥ 4 .

Portanto, foi um objetivo da presente invenção prover uma solução nova, simples e não onerosa para demonstrar que a contaminação viral é depurada de modo confiável, isto é, removida ou inativada.

A invenção alcança este objetivo pela provisão de um método para a validação de depuração viral contínua compreendendo as etapas de:

- a) provisão de uma sonda a ser validada;
- b) enriquecimento da amostra de uma maneira válida;
- c) realização da depuração viral;
- d) amostragem da sonda enriquecida; e
- e) análise da amostra da sonda enriquecida da etapa d).

Este método tem a vantagem de que ele permite uma validação da depuração viral contínua e simples e não onerosa.

Como usado aqui, o termo "validação" se refere ao processo de estabelecimento de evidência ou um alto grau de garantia de que um processo, método ou sistema específico produzirá de modo consistente um resultado que satisfaça os critérios de aceitação predeterminados.

Na indústria farmacêutica, por exemplo, é muito importante assegurar que o processo adaptado para se produzir produza de modo consistente os resultados esperados.

Como usado aqui, o termo "contínuo" se refere ao fato de que a validação é realizada continuamente à medida que a sonda é processada. Em contraste, em um método de "lote", uma carga completa de uma sonda, por exemplo, um

produto, seria validada em um dado momento no tempo. Em outras palavras, um processo contínuo como usado aqui se refere a um processo para a realização de pelo menos duas etapas de processo em série, pelo que a segunda etapa de processo começa a processar a sonda antes da primeira etapa de processo ser concluída.

Como usado aqui, o termo "depuração" se refere à remoção de partículas virais ou inativação de partículas virais.

Assim, a etapa de realização da depuração viral resulta em menos partículas virais estarem presentes na sonda e/ou nas partículas virais não serem mais capazes de infectar as células especialmente células hospedeiras, isto é, elas são inativadas.

Como usado aqui, o termo "sonda" se refere a uma substância que contém potencialmente vírus.

Como usado aqui, o termo "enriquecimento" se refere ao aumento de forma deliberada da quantidade de carga substancialmente viral.

Como usado aqui, o termo "vírus" é usado intercambiavelmente com o termo "partícula viral" e se refere a um agente que é menor do que uma bactéria e que somente pode reproduzir após a infecção de uma célula hospedeira.

Em muitos casos de estudos de depuração viral, a concentração de vírus em uma dada amostra é extremamente baixa. Em outros processos de extração, baixos níveis de impureza podem ser insignificantes, mas visto que os vírus são impurezas infecciosas, mesmo uma partícula viral pode ser suficiente para arruinar uma cadeia de processo inteira. É por esta razão que medições especiais devem ser feitas para determinar o método de remoção ou inativação apropriado para qualquer tipo de vírus que esteja sendo extraído de qualquer tipo de sonda.

Os estudos de enriquecimento foram criados especificamente para este propósito. Um estudo de enriquecimento é um estudo feito a fim de determinar os possíveis métodos de remoção viral, isto é, depuração ou inativação. Eles se baseiam no princípio de que o aumento da contagem viral (ou nível de atividade) de uma sonda por um fator de 10^4 ou 10^5 do original não somente mudará as razões de remoção/inativação viral por uma ordem de magnitude. A partir deste conhecimento, os estudos de enriquecimento conhecidos na técnica anterior foram criados nos quais o número de vírus (ou nível de ativação) é aumentado ou "enriquecido" por um fator de 10^4 ou 10^5 da sonda original. Uma sonda com este novo número ou nível de atividade alto é a seguir tipicamente submetida ao método de depuração de escolha. Na técnica anterior, a contagem viral ou nível de atividade é tomado no início e no final do método de depuração de escolha e usado no cálculo do fator de redução. Este fator de redução (RF) de estudos convencionais para uma etapa de remoção ou inativação de vírus é calculado usando a seguinte equação:

$$RF_{\text{step}} = \log_{10} [(V1 \times T1)/(V2 \times T2)]$$

Onde:

- V1 = volume de matéria-prima enriquecida antes da etapa de depuração;
- T1 = concentração de vírus da matéria-prima enriquecida antes da etapa de depuração;
- V2 = volume de material após a etapa de depuração; e
- T2 = concentração de vírus do material após a etapa de depuração.

Como usado aqui, o termo "maneira válida" se refere ao fato de que o enriquecimento precisa ser realizado de

forma reproduzível e o nível desejado de carga viral da partícula tem que ser sempre assegurado.

Em outras palavras, deve ser assegurado que o ponto de enriquecimento seja escolhido de tal maneira que a carga viral da partícula alcance de modo consistente o nível desejado independentemente da operação unitária antes da depuração viral.

Consequentemente, o método de depuração viral precisa considerar as características especiais de um processo contínuo, por exemplo, variação dos níveis de pH, tempo de permanência, temperatura, concentrações do aditivo, homogeneidade da solução e condutividade.

Em uma realização do método para a validação, a sonda é uma corrente e/ou uma corrente de produtos.

Como usado aqui, o termo "corrente" se refere a um fluxo contínuo de líquido e/ou gás.

Como usado aqui, o termo "corrente de produtos" se refere a uma corrente compreendendo um produto.

Em uma realização do método para validação descrito aqui, a sonda é uma corrente de produtos. Esta corrente de produtos, por exemplo, flui de uma operação unitária para outra operação unitária até que o produto tenha alcançado as características desejadas.

Em uma realização alternativa do método para validação descrito aqui, a sonda é uma corrente. Esta corrente pode ser, por exemplo, uma corrente que entra em um processo de produção.

O mesmo processo de produção pode compreender tanto o método para validação descrito aqui, em que a sonda é uma corrente de produtos, e o método para validação descrito aqui, em que a sonda é uma corrente.

O fator de redução necessário para uma determinada corrente e/ou uma corrente de produtos é dependente de muitos fatores diferentes, alguns dos quais incluem:

- a concentração inicial esperada de vírus e/ou;
- o produto sendo purificado e/ou;
- a dose infecciosa do vírus (para uso *in vivo*) e/ou;
- quando a inativação for uma alternativa viável para a completa remoção e, se este for o caso, as condições de inativação.

Para a adição do material de enriquecimento, uma bomba ou uma seringa pode ser usada.

Em uma realização preferida do método para validação descrito aqui, a etapa de enriquecimento da amostra de uma maneira válida é realizada usando um conector, por exemplo, uma junção em Y e/ou uma junção em T.

Em uma realização preferida do método para validação descrito aqui, nenhuma unidade de mistura é usada para misturar a corrente e/ou corrente de produtos e o material de enriquecimento.

Em uma realização alternativa, um misturador estático e/ou um vaso de mistura ou vaso sem mistura é usado para misturar a corrente e/ou corrente de produtos e o material de enriquecimento.

Em uma realização do método para validação descrito aqui, a etapa d) de amostragem da sonda enriquecida compreende a amostragem por um período de tempo predeterminado.

Esta realização é vantajosa visto que ela considera que em um processo de produção contínuo, a corrente de produtos pode ser submetida a condições periodicamente flutuantes em operações unitárias diferentes, por exemplo,

com relação ao valor de pH, condutividade ou concentração do produto.

A vantagem desta realização se torna especialmente clara ao se referir ao exemplo descrito abaixo. Neste exemplo, a corrente de produtos é um eluato de uma cromatografia contínua e um inversor de fluxo em espiral (CFI) é usado para a inativação viral. Nesta realização, a amostragem por período de tempo predeterminado, isto é, uma duração de amostragem fixa tem o efeito de que as influências do pH flutuante resultantes da cromatografia contínua são excluídas. Nesta realização preferida, é mais preferido que a duração da amostragem seja ajustada a um tempo de troca.

Como usado aqui, o termo "tempo de troca" se refere ao tempo no qual a cromatografia contínua elui uma coluna específica antes da troca para a próxima coluna para a eluição.

Por meio do ajuste da duração da amostragem para um tempo de troca, a completa coleta dos níveis de pH esperados resultantes da cromatografia contínua é coletada. Em outras palavras, por meio da amostragem durante um período de tempo predeterminado, por exemplo, um tempo de troca, as condições periodicamente flutuantes são consideradas. De outra forma - por exemplo, no caso de medições de pH após uma cromatografia contínua - o resultado pode ser falsificado ou não reproduzível dependendo de quando uma amostra é tirada em um momento no tempo quando a corrente de produtos que sai da cromatografia contínua está em um alto nível de pH comparado a um momento no tempo quando a corrente de produtos que sai da cromatografia contínua está em um baixo nível de pH.

Assim, a fim de prover um método que fornece de modo confiável o mesmo resultado sob as mesmas condições, isto é, que é adequado para um procedimento de validação para a inativação viral contínua, é preferido que a etapa de

amostragem da sonda enriquecida compreenda a amostragem por um período de tempo predeterminado, por exemplo, um tempo de troca, sempre que a operação unitária que precede a inativação viral tiver condições periodicamente flutuantes.

Em uma realização do método para validação descrito aqui, a sonda compreende pelo menos um componente selecionado do grupo que consiste em um peptídeo, proteína, uma pequena molécula farmacêutica, um ácido nucleico.

Como usado aqui, o termo "peptídeo" se refere a um polímero de aminoácidos de comprimento relativamente curto (por exemplo, menos do que 50 aminoácidos). O polímero pode ser linear ou ramificado, ele pode compreender aminoácidos modificados e ele pode ser interrompido por não aminoácidos. O termo também abrange um polímero de aminoácido que foi modificado; por exemplo, por formação de ligação dissulfeto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação ou qualquer outra manipulação, tal como conjugação com um componente de rotulação, tal como, entre outros, marcadores fluorescentes, partículas, biotina, contas, proteínas, marcadores radioativos, etiquetas quimioluminescentes, marcadores bioluminescentes e os similares.

Como usado aqui, o termo "proteína" se refere a um polipeptídeo de aminoácidos. O termo abrange proteínas que podem ser de comprimento total, do tipo selvagem ou fragmentos destes. A proteína pode ser humana, não humana e um mimético artificial ou químico de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, assim como a polímeros de aminoácido de ocorrência natural e polímero de aminoácido de ocorrência não natural.

Preferivelmente, a proteína é uma proteína terapêutica.

Como usado aqui, o termo "proteína terapêutica" se refere a uma proteína que pode ser administrada a um

organismo para provocar uma resposta biológica ou médica de um tecido, um órgão ou um sistema do dito organismo.

Ainda mais preferivelmente, a proteína é um anticorpo.

O termo "anticorpo" como usado aqui se refere a uma molécula de ligação tal como uma imunoglobulina ou porção imunologicamente ativa de uma imunoglobulina, isto é, uma molécula que contém um local de ligação ao antígeno.

Como usado aqui, o termo "pequena molécula farmacêutica" se refere a um composto com baixo peso molecular (< 900 daltons) que pode ajudar a regular um processo biológico.

Como usado aqui, o termo "ácido nucleico" se refere a deoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos e polímeros destes na forma de filamento único ou duplo. A menos que especificamente limitado, os termos abrangem ácidos nucleicos contendo análogos de nucleotídeos naturais que têm propriedades de ligação similares como o ácido nucleico de referência e são metabolizados de uma maneira similar aos nucleotídeos de ocorrência natural. A menos que indicado o contrário, uma sequência de ácido nucleico particular também abrange implicitamente as variantes conservativamente modificadas destes (por exemplo, substituições de códon degenerativas) e sequências complementares assim como a sequência explicitamente indicada.

No exemplo descrito abaixo, um inversor de fluxo em espiral (CFI) foi usado para a inativação viral. Ele foi construído para apresentar um tempo de permanência mínimo definido.

Como usado aqui, o termo "tempo de permanência mínimo" se refere ao tempo que um vírus único/partícula viral pelo menos permanece em um dispositivo dado, por exemplo, o CFI.

Em uma realização do método para validação descrito aqui, a etapa de enriquecimento da amostra de uma maneira válida compreende enriquecimento da amostra após a homogeneização.

Como usado aqui, o termo "homogeneização" se refere a uma operação unitária que assegura que as uma ou mais características da sonda que é importante para a depuração viral é consistente dentro da sonda.

Por exemplo, se a sonda for uma corrente de produtos, a operação unitária antes da depuração viral é uma cromatografia contínua e a característica da sonda que é importante para a depuração viral é um valor de pH. A homogeneização assegura que a corrente de produtos inteira ao sair da homogeneização esteja no mesmo nível de pH.

Em uma realização preferida, a homogeneização é conduzida em um *loop* de homogeneização.

Como usado aqui, o termo "*loop* de homogeneização" se refere a um reator de tanque agitado contínuo (CSTR) construído da tubulação. Em outras palavras, o *loop* de homogeneização não consiste em um tanque grande com um dispositivo de agitação, mas preferivelmente de uma disposição circular de tubulações através das quais a corrente é bombeada. Uma vez que o fluxo de volume interno é maior do que o fluxo de entrada e saída, uma boa mistura da corrente de entrada é alcançada.

Ao usar um *loop* de homogeneização como um reator de tanque agitado contínuo (CSTR) a fim de ajustar o nível de pH da cromatografia contínua, que flutua entre pH 3 e pH 7, é impossível identificar de qual coluna de cromatografia concreta uma dada amostra se origina. Portanto, o volume amostrado poderia reter o eluato de uma ou mesmo duas colunas não especificadas do sistema de cromatografia contínua. A fim de excluir a influência de diferentes colunas de

cromatografia, alguns pontos da amostra dentro do CFI foram amostrados duas vezes.

No exemplo discutido abaixo, o ponto de enriquecimento foi ajustado após o *loop* de homogeneização.

Este foi o caso uma vez que o CFI era o dispositivo de inativação viral atual com baixo pH. Portanto, um enriquecimento antes do *loop* de homogeneização teria causado uma perda potencial em LRV máximo porque a sonda tem um determinado tempo de permanência em níveis com baixo pH no *loop* de homogeneização antes da atual operação unitária (UO), isto é, a inativação viral com baixo pH no CFI.

Em uma realização do método para validação descrito aqui, a depuração viral da etapa c) é uma inativação viral.

Esta inativação viral é preferivelmente realizada em um nível de $\text{pH} \leq 4$. A inativação viral nestas condições tem o efeito de que, dado um tempo de permanência adequado, ela inativa de modo confiável vírus envelopados grandes.

Em uma realização do método para validação descrito aqui, a depuração viral da etapa c) a depuração viral é uma inativação viral, que é realizada em um inversor de fluxo em espiral (CFI).

Esta inativação viral é, por exemplo, realizada em um nível de $\text{pH} \leq 4$ em um CFI. O uso do CFI é vantajoso visto que ele assegura que o tempo de permanência necessário para a inativação viral é confiável e assegurado redutivamente.

Preferivelmente, a inativação viral é realizada em um nível de $\text{pH} \leq 4$.

No entanto, a inativação viral também pode ser alcançada usando solventes e/ou detergentes tais como tri(n-butil)fosfato e Tween ou Triton X-100 ou outros produtos químicos de inativação tais como iodo ou beta-propiolactona. Em adição, a inativação viral usando o CFI também pode ser

alcançada por meio de irradiação e/ou precipitação, por exemplo, usando ácido caprílico.

Além disso, uma combinação de inativação viral por meio de tratamento com baixo pH e o uso de solventes e/ou detergentes e/ou irradiação e/ou precipitação podem ser empregados.

Em uma realização adicional do método para validação descrito aqui, a depuração viral da etapa c) é realizada em um reator de fluxo em pistão, um tubo reto e/ou uma hélice reta em adição ou em vez de um CFI.

Ainda em outra realização do método para validação descrito aqui, a etapa de amostragem da sonda enriquecida compreende amostragem de trás para frente.

Como usado aqui, o termo "amostragem de trás para frente" se refere a um método no qual a amostragem é iniciada no final de um processo e a seguir progride em direção ao início do dito processo.

Por exemplo, no caso de inativação viral no CFI, a amostragem de trás para frente significa que as primeiras amostras são tiradas em ou próximo à saída do CFI, a seguir a amostragem progride em direção à entrada do CFI, isto é, contra o fluxo da corrente no CFI.

No caso de inativação viral como processo contínuo, a amostragem de trás para frente tem a vantagem de que a corrente ou a corrente de produtos não tem que ser interrompida a fim de tirar uma amostra no início do processo contínuo. No caso do exemplo descrito abaixo tal pausa da corrente contínua de produtos corromperia a análise visto que a inativação viral continuaria no valor com baixo pH de ≤ 4 , mas a corrente de produtos não avançaria para o CFI. Consequentemente, o nível de inativação viral não mais estaria correlacionado à distância que a corrente de produtos avançaria no CFI. Em adição, a parte exigida do CFI teria que

ser lavada e alcançar o estado constante inicialmente após cada amostragem, levando a durações do experimento amplamente aumentadas.

Além disso, a amostragem dentro do CFI leva a um distúrbio dos padrões de fluxo interno. Portanto, o método de amostragem tinha que ser escolhido cuidadosamente a fim de garantir resultados válidos também por esta razão. Assim, no exemplo descrito abaixo a amostragem foi iniciada a XM18 e terminou com XM12 (cf. Figura 3).

Ainda em outra realização do método para validação descrito aqui, a etapa de amostragem da sonda enriquecida compreende a neutralização imediata de cada gota da sonda quando ela entra em um recipiente de amostragem.

A característica de neutralizar imediatamente cada gota da sonda quando ela entra em um recipiente de amostragem pode ser alcançada por meio de enchimento do recipiente com um tampão que troca imediatamente os valores de pH para ~ pH 7, por exemplo, 2 M tampão Tris. Assim, é assegurado que nos casos de inativação viral usando valores com baixo pH, que é altamente dependente do tempo, a reação é interrompida de modo confiável mediante a amostragem, dessa forma prevenindo tempos de permanência não homogêneos em níveis com baixo pH dentro das amostras.

Preferivelmente, as amostras são tiradas por meio de torneiras de três vias. Além disso, qualquer método de retirada de uma amostra pode ser usado o qual permita tirar amostras sem interromper o processo, por exemplo, junções em T podem ser usadas ou o tubo do CFI pode ser encurtado sucessivamente.

Ainda em outra realização do método para validação descrito aqui, a etapa d) de análise da amostra da sonda enriquecida compreende a determinação de quando as partículas virais estão presentes.

Esta determinação pode ser realizada por meio de um método que permita o aumento nos números de partículas virais e sua determinação, por exemplo, usando métodos padrão conhecidos na técnica tais como sequências de última geração e/ou outros métodos com base em PCR em combinação com os métodos de sequenciação.

Em uma realização adicional do método para validação descrito aqui, a etapa d) - análise da amostra da sonda enriquecida - compreende a quantificação das partículas virais.

Em geral, a quantificação viral envolve a contagem do número de vírus em um volume específico para determinar a concentração de vírus por meio de métodos tais como ensaio de placas, ensaio formador de foco, titulação *endpoint* - também denominada ensaio de diluição *endpoint* - ensaios de quantificação de vírus com base em proteína, microscopia eletrônica de transmissão, sensor de pulso resistivo sintonizável, PCR quantitativa e/ou plaqueamento de grandes volumes.

Preferivelmente, a dita quantificação de partículas virais é alcançada por meio de titulação *endpoint* e/ou plaqueamento de grandes volumes.

A titulação *endpoint* - também denominada ensaio de diluição *endpoint* - quantifica a quantidade de vírus exigida para matar 50% dos hospedeiros infectados ou para produzir um efeito citotóxico em 50% de células de cultura de tecidos inoculadas. Assim, ela se refere à dose infecciosa em cultura de tecidos (TCID₅₀) como a medida do título infeccioso do vírus. Quando usado no contexto da cultura de tecidos, as células hospedeiras são plaqueadas e diluições seriadas do vírus são adicionadas. Após a incubação, a porcentagem de morte celular (isto é, células infectadas) é observada manualmente e registrada para cada diluição do vírus e os

resultados são usados para calcular matematicamente um resultado de TCID₅₀. Dois métodos comumente usados para calcular a TCID₅₀ são o método Spearman-Kärber e o método Reed-Muench.

O plaqueamento de grandes volumes (LVP) se refere ao mesmo método de detecção que o ensaio de TCID₅₀. Em contraste com a titulação *endpoint*, uma quantidade muito maior de líquido é usada para o LVP, levando a um limite muito menor de detecção.

Ainda mais preferivelmente, a dita quantificação de partículas virais é alcançada por meio de uma combinação de titulação *endpoint* e plaqueamento de grandes volumes.

Preferivelmente, o vírus depurado é um vírus envelopado grande. Além disso, é possível depurar vírus não envelopados pequenos por meio de filtros de vírus.

Preferivelmente, para a realização do método para validação descrito aqui, equipamento de uso único é empregado.

Preferivelmente, para a realização do método para validação descrito aqui, equipamento descartável é empregado.

Em uma realização preferida, o equipamento é de uso único e descartável.

Em um aspecto diferente, a presente invenção se refere ao uso do método para validação descrito aqui em um processo contínuo para a produção de proteínas terapêuticas.

Assim, em geral o método para validação descrito aqui pela primeira vez supera o preconceito na técnica anterior de que a depuração viral deve ser realizada em um processo em lotes a fim de assegurar um tempo de permanência definido.

Além disso, o método para validação descrito aqui demonstra pela primeira vez que é possível:

- transferir um tempo de permanência definido do lote para um processo contínuo;
- assegurar um procedimento de enriquecimento válido em um processo contínuo;
- realizar a validação em condições de processo sem prejudicar o processo por si só por meio da escolha de um ponto de enriquecimento válido;
- coletar amostras representativas enquanto considera todas as flutuações e dificuldades de medição, por exemplo, flutuação de bombas, pH, concentração de vírus, flutuações de concentração, medição das condições da corrente;
- criar um procedimento de amostragem válido sem prejudicar os pontos de amostragem posteriores.

Exemplo

Abaixo é descrito um método exemplar para a realização da validação da depuração viral contínua.

Para todos os experimentos, um protótipo de uma unidade de cromatografia Tarpon Biosistemas BioSMB foi usado. A análise de todos os experimentos incluiu a medição de pH e condutividade com a ajuda de eletrodos de pH e sensores de condutividade luer de uso único, respectivamente, assim como ensaios para determinação da concentração de vírus.

Além disso, um inversor de fluxo em espiral (CFI) foi usado para a inativação viral. Ele foi construído para apresentar um tempo de permanência mínimo de 120 min. Portanto, o tempo de permanência médio é maior do que 120 min e foi determinado por caracterização de RTD (distribuição do tempo de permanência) como descrito abaixo. Uma imagem da configuração final de CFI pode ser vista na Figura 3.

A configuração geral da planta pode ser vista na Figura 1. Nesta configuração, a etapa de inativação viral com baixo pH é colocada após a unidade de cromatografia. O perfil

de eluição da unidade cromatografia Tarpon BioSMB mostra um nível de pH periodicamente flutuante entre o tampão de eluição (pH 3,1) e o tampão de lavagem (pH 7,0). Visto que o pH total para a inativação viral com baixo pH deve ficar abaixo de 4, um *loop* de homogeneização é realizado para a equalização do perfil do pH. Em outras palavras, o *loop* de homogeneização (HL) pode ser entendido como um reator de tanque agitado contínuo (CSTR) levando a níveis de pH constantemente abaixo de 4. Após o HL, a atual inativação viral com baixo pH ocorre dentro do inversor de fluxo em espiral (CFI).

A fim de caracterizar as duas operações unitárias HL e CFI, estudos de distribuição de tempo de permanência foram realizados. A mudança na condutividade entre água MilliQ e 1 M solução de NaCl foi medida. Em detalhes, a taxa de fluxo foi ajustada para 4,8 mL/min. As funções da etapa foram realizadas com a ajuda de uma torneira de três vias. Três configurações diferentes foram investigadas: o HL(A), o CFI (B) e a combinação de HL e CFI (C). As funções da etapa foram realizadas em ambas as direções possíveis. Portanto, após o complete enchimento com 1 M solução de NaCl, o experimento foi repetido na outra direção pelo enchimento da UO, isto é, do CFI ou do HL com água MilliQ em fluxo constante de 4,8 mL/min. As medições da concentração foram normalizadas para 1 e limitadas a valores entre 0,5% e 99,5% do valor máximo. O tempo de permanência médio foi determinado por integração numérica usando a regra do trapézio. O tempo de permanência foi então normalizado para um com a ajuda do tempo de permanência médio. A largura relativa R_w foi calculada de acordo com a equação **Erro! Fonte de referência não encontrada..** $\Theta_{0,005}$ e $\Theta_{0,995}$ representam por meio deste que os pontos no tempo adimensionais foram 0,5% e 99,5% e que a

concentração adimensional máxima é alcançada. A largura relativa, portanto, mostra o quão estreita a RTD é

$$R_W = \frac{\theta_{0,005}}{\theta_{0,995}} \quad (1)$$

Dois métodos de cromatografia contínua diferentes foram testados a fim de investigar dois níveis de pH médio diferentes para a inativação viral com baixo pH. O procedimento experimental para ambos os métodos foi o mesmo. Em detalhes, o CFI foi iniciado e CIPed (limpo no lugar) independentemente da cromatografia. Antes do primeiro experimento com vírus, o CFI foi completamente lavado com tampão e CIPed com 0,1 M solução de NaOH. Depois disso, outra lavagem com tampão foi realizada, levando ao sistema todo sem bolhas de ar ficar preso. Em paralelo, a cromatografia contínua foi iniciada, que precisou de 2,5 h de corrida inicial antes de a primeira coluna passar por todos os ciclos uma vez. O sistema HL e CFI foram conectados à cromatografia contínua durante a fase inicial após o procedimento de lavagem e CIP. Após as primeiras 2,5 h de cromatografia contínua, o CFI teve que ser cheio completamente com eluato de cromatografia enriquecido por 3 h a fim de alcançar o estado constante. A duração necessária de 3 h foi determinada a partir dos experimentos de RTD correspondentes. Após o primeiro experimento com vírus, o CFI foi CIPed com 5 M NaOH por pelo menos 1 h.

Um novo procedimento de enriquecimento para um processo contínuo teve que ser desenvolvido. A fim de alcançar o nível de enriquecimento padrão de 5%, 230 µL/min de material de enriquecimento tiveram que ser adicionados aos 4,6 mL/min de corrente de eluato de cromatografia. Uma bomba Gilson Minipuls 3 foi usada para adicionar a corrente de enriquecimento à corrente de eluato de cromatografia por meio de um conector. Nenhuma unidade de mistura interna foi usada.

O ponto de enriquecimento foi ajustado após o *loop* de homogeneização.

A fim de retirar as amostras de diferentes pontos no tempo dentro do CFI, torneiras de três vias foram introduzidas entre determinados quadros. Os pontos de amostragem assim como o CFI final podem ser vistos na Figura. 3. Os pontos no tempo que são representados pelos diferentes pontos de amostragem foram determinados pela medição do tempo de permanência médio dentro do CFI completo. Visto que a inativação viral com baixo pH é altamente dependente do tempo, a reação teve que ser interrompida durante o procedimento de amostragem. Portanto, cada recipiente de amostragem foi cheio de 4,13 mL de 2 M tampão Tris antes da amostragem. Com a ajuda deste método, o pH de cada gota de amostra foi neutralizado imediatamente ao entrar no recipiente de amostragem. Isto impediu tempos de permanência não homogêneos em níveis com baixo pH dentro das amostras.

A fim de excluir influências do pH flutuante, a duração da amostragem foi ajustada a um tempo de troca (17,3 min) da cromatografia contínua. Isto leva a uma coleta completa dos níveis de pH esperados a partir da cromatografia contínua.

Ao usar um *loop* de homogeneização como um reator de tanque agitado contínuo (CSTR) a fim de ajustar o nível de pH da cromatografia contínua, que flutua entre pH 3 e pH 7, é impossível identificar de qual coluna de cromatografia concreta se origina uma dada amostra sem qualquer CFI. Portanto, o volume amostrado poderia reter o eluato de uma ou mesmo duas colunas não especificadas do sistema de cromatografia contínua. A fim de excluir a influência de diferentes colunas de cromatografia, alguns pontos de amostra dentro do CFI foram amostrados duas vezes. A primeira amostra foi tirada dentro de um tempo de troca (17,3 min). Depois

disso, a amostragem foi pausada por metade de um tempo de troca (8,65 min) antes que a amostragem fosse continuada por outro tempo de troca. Dentro da pausa da amostragem, a posição da torneira de três vias não foi alterada. O fluxo contínuo através do ponto de amostra foi alimentado em um recipiente de resíduos. Com este procedimento, nenhum fluido residual foi aprisionado dentro do sistema de amostragem. O fluido residual poderia ser exposto a níveis com baixo pH por um tempo de permanência prolongado e, portanto, falsificar os resultados.

Com a ajuda dos resultados da água e solução de NaCl, experimentos realizados a fim de caracterizar o loop de homogeneização (HL) e inversor de fluxo em espiral (CFI) usados, os tempos de permanência correspondentes aos pontos de amostragem foram determinados. Os resultados das medições RTD podem ser vistos na Figura 4.

Como mencionado acima, o CFI foi designado para apresentar um tempo de permanência mínimo de 120 min.

Antes dos experimentos realizados, ensaios de citotoxicidade e interferência foram realizados. A diluição final necessária da amostra foi determinada como sendo de 1:54. Com este fator de diluição, nenhum efeito sobre o crescimento celular e a replicação viral poderia ser observado.

As medições de pH e condutividade de ambos os modos de cromatografia contínua mostram um comportamento periodicamente flutuante. Além disso, um efeito de esfriamento do HL assim como parcialmente do CFI pode ser visto.

A Figura 1 mostra uma vista geral esquemática de um esquema de processo para um estudo pré-viral.

A Figura 2 mostra uma configuração experimental para medições de RTD.

Cond = sensor de condutividade, configuração A para medições de RTD de HL, configuração B para medições de RTD de CFI, configuração C para medições de RTD de ambas UO juntas.

A Figura 3 mostra uma vista geral esquemática dos pontos de amostragem assim como do CFI final.

A Figura 4 descreve os resultados da caracterização de distribuição do tempo de permanência.

O diagrama esquerdo superior da Figura 4 mostra os resultados da caracterização de RTD para o CFI. O tempo de permanência médio foi determinado a 145 min com uma largura relativa R_w de 0,819. Consequentemente, cada braço fora dos 10 braços realizados dentro do CFI provê um tempo de permanência de 14,5 min. A RTD dentro do CFI é muito estreita, levando a um tempo de permanência minimizado de todo elemento de fluido único, isto é, partícula viral.

O diagrama esquerdo inferior da Figura. 4 mostra os resultados para o HL. Ele mostra o comportamento típico de CSTR RTD. O tempo de permanência médio é de 8,12 min, a R_w é 0,027. O diagrama direito superior da Figura. 4 mostra a medição para a combinação de HL e CFI. Em comparação com os resultados de CFI mostrados no diagrama esquerdo superior, o tempo de permanência médio aumenta para 154 min, a largura relativa diminui para 0,739. O diagrama direito inferior da Figura. 4 mostra a comparação geral dos resultados experimentais assim como gráficos calculados para tubos retos laminares e hélices retas laminares. A combinação de HL e de CFI leva a uma distribuição do tempo de permanência visivelmente mais ampla do que usando somente o CFI. No entanto, ambas as constelações mostram uma RTD significativamente melhor do que as alternativas, o tubo reto laminar e a hélice reta laminar.

A Figura: 5 descreve os resultados do processo contínuo do estudo pré-viral.

O título viral e os resultados de LRV dos dois experimentos podem ser vistos na Figura. 5. A parte superior do diagrama mostra os resultados da amostragem única com o modo A de cromatografia contínua. As primeiras duas colunas representam os resultados do título viral para a amostra de carga e retenção. Visto que nenhuma diminuição no título viral pode ser vista para a amostra de retenção, as condições de processo (por exemplo, temperatura e composição tampão) assim como o item de teste por si só (mAB) não têm qualquer influência sobre a estabilidade do vírus. Portanto, a inativação viral é somente causada pelas condições de baixo pH. As colunas no meio do diagrama mostram os valores de título viral e LRV correspondente a partir das amostras de titulação. O título viral em todas as amostras foi reduzido até o limite de detecção, levando a valores ">" LRV. A redução de LRV de 4,12 (1M16) para 4,01 em amostras 1M17 e 1M18 é causada por fatores de diluição diferentes visto que as amostras 1M17 e 1M18 foram adicionalmente analisadas por meio de plaqueamento de grandes volumes. Portanto, os volumes analisados estão mudando de 33,33 μ L (1M16) para 44,44 μ L (1M17 e 1M18). No lado direito do diagrama, os resultados de LVP da amostra 1M17 e 1M18 podem ser vistos. Mesmo com um volume analisado de 2.133,33 μ L, nenhuma cavidade infectada poderia ser encontrada, levando a valores de LRV de > 5,82.

O diagrama do meio e o inferior da Figura 5 mostram os resultados das duas amostragens com modo B da cromatografia ProtA. O procedimento de amostragem foi iniciado com 3M18 por 17,31 min. Após uma pausa de 8,66 min, a amostra 4M18 foi retirada. A amostragem adicional foi também feita em pares.

A Figura 6 mostra um diagrama esquemático do valor de redução de log (LRV) do título viral contra o tempo de permanência no CFI, que no caso do CFI é igual a um local

específico no CFI. Em outras palavras, uma dada redução de log do título viral é sempre alcançada no mesmo local dentro do CFI devido à cinética de reação no CFI. Consequentemente, o LRV no ponto no tempo dado 1 sempre corresponderá ao dito LRV no ponto de amostragem específico dentro do CFI, por exemplo, neste caso o ponto de amostragem após o quadro 1. Da mesma forma, neste exemplo, o LRV no ponto no tempo 6 sempre corresponderá ao LRV no ponto de amostragem após o quadro 6. Portanto, a amostragem da sonda enriquecida é específica do local em vez de específica do ponto no tempo visto que esse seria o caso sob condições de lote.

Referências

Klutz, S.; Magnus, J.; Lobedann, M.; Schwan, P.; Maiser, B.; Niklas, J.; Temming, M.; Schembecker, G. (2015): Developing the biofacility of the future based on continuous processing and single-use technology. In Journal of Biotechnology 213, pp. 120-130

Klutz, S.; Kurt, S. K.; Lobedann, M.; Kockmann, N. (2015): Narrow residence time distribution in tubular reactor concept for Reynolds number range 10-100. In Chemical Engineering Research and Design 95, pp. 22-33.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA A VALIDAÇÃO DE DEPURAÇÃO VIRAL CONTÍNUA, caracterizado por compreender as etapas:

- a) provisão de uma sonda a ser validada;
- b) enriquecimento da amostra de uma maneira válida;
- c) realização da depuração viral;
- d) amostragem da sonda enriquecida; e
- e) análise da amostra da sonda enriquecida da etapa d).

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela sonda ser uma corrente e/ou uma corrente de produtos.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pela etapa d) de amostragem da sonda enriquecida compreender a amostragem por um período de tempo predeterminado.

4. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pela etapa b) de enriquecimento da amostra de uma maneira válida compreender o enriquecimento da amostra após a homogeneização.

5. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado na etapa c) pela depuração viral ser uma inativação viral.

6. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado na etapa c) pela depuração viral ser uma inativação viral que é realizada em um CFI.

7. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pela etapa de amostragem da sonda enriquecida compreender amostragem de trás para frente.

8. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pela etapa de amostragem da sonda enriquecida compreender a neutralização

imediate de cada gota da sonda quando ela entra no recipiente de amostragem.

9. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pela etapa d) de análise da amostra da sonda enriquecida compreender a determinação de quando as partículas virais estão presentes.

10. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pela etapa d) de análise da amostra da sonda enriquecida compreender a quantificação das partículas virais.

11. USO DO MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado por ser em um processo contínuo para a produção de proteínas terapêuticas.

Fig. 1

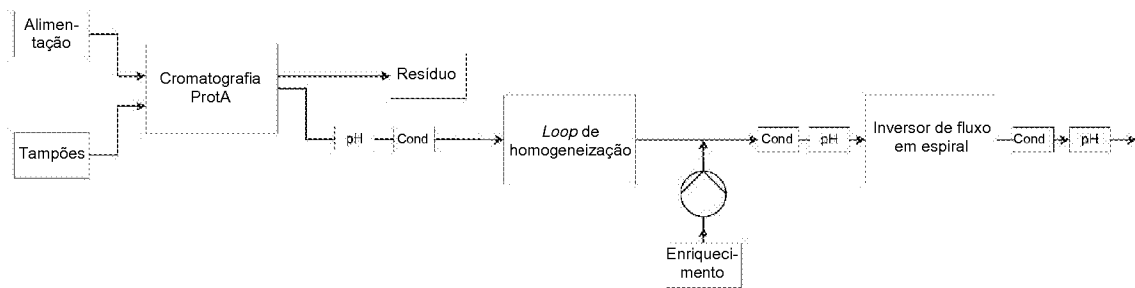


Fig. 2

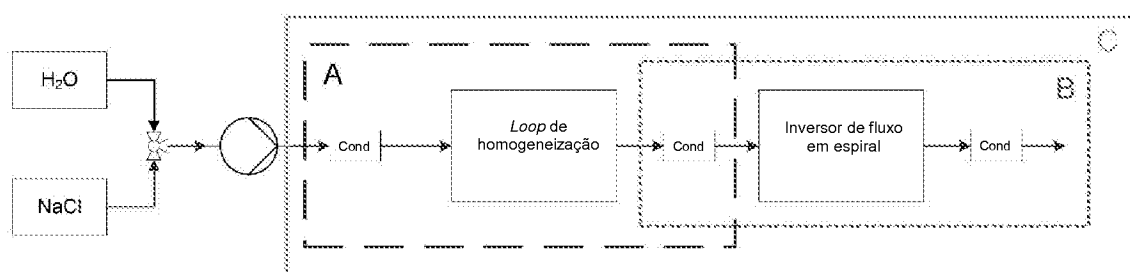


Fig. 3

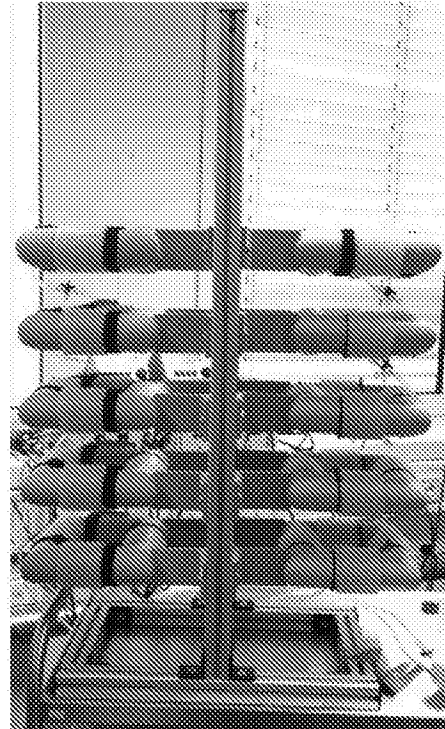
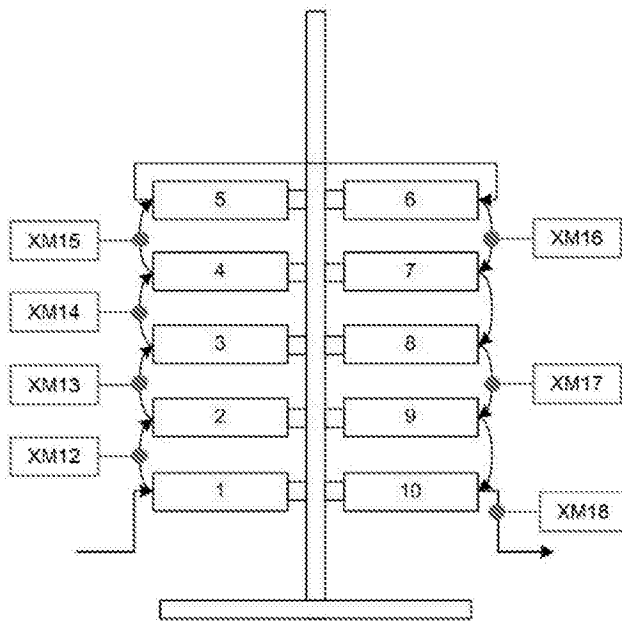
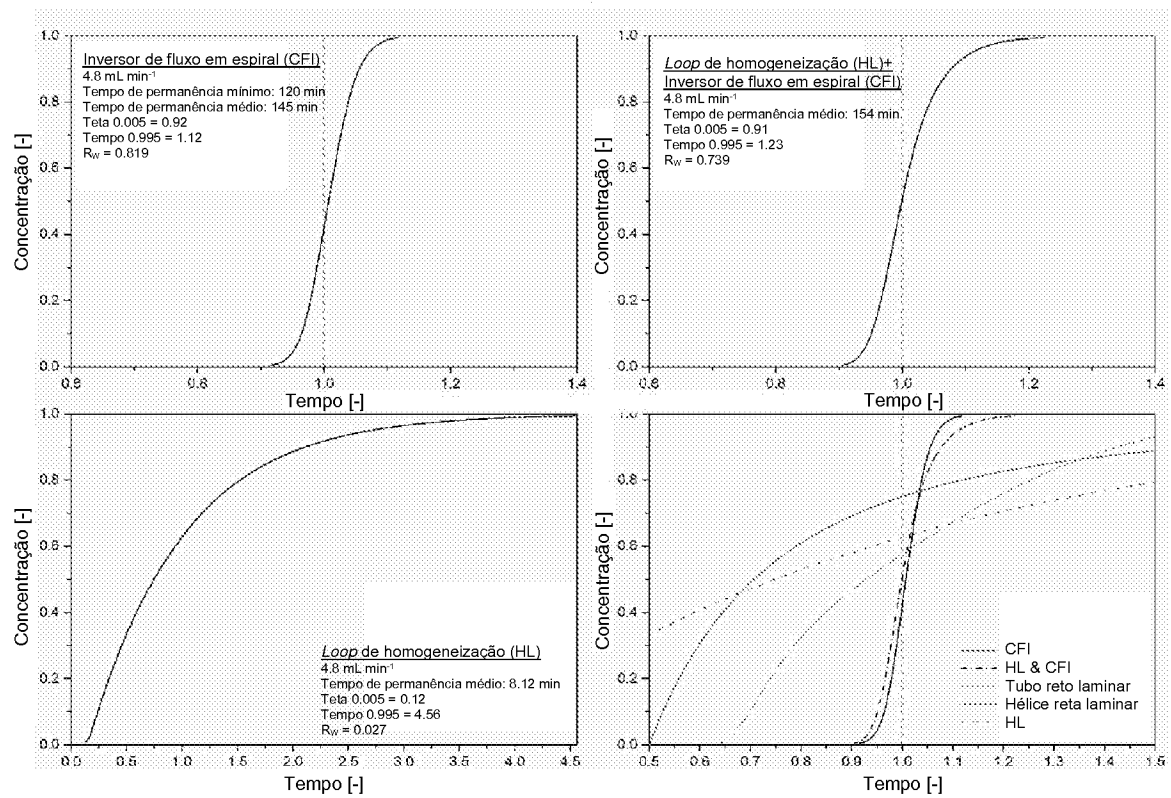


Fig. 4



5/6

Fig. 5

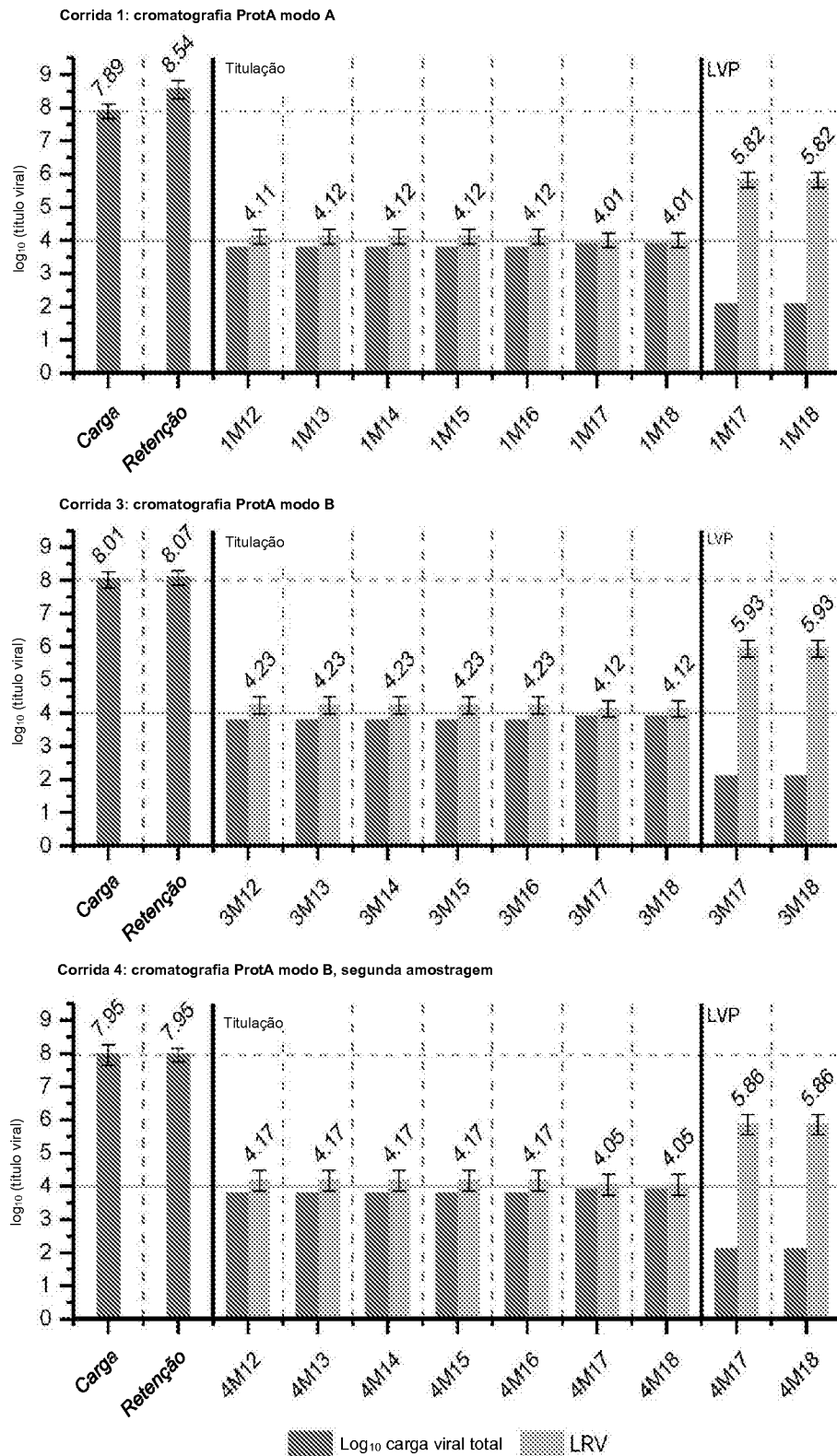
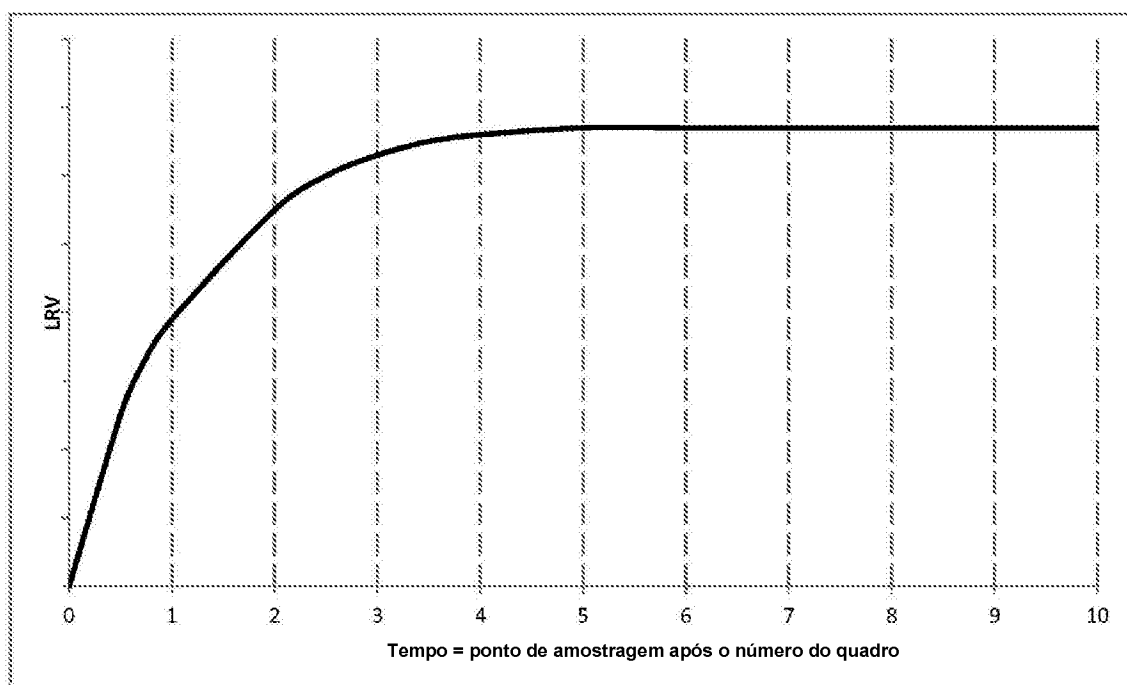


Fig. 6



RESUMO

VALIDAÇÃO DA DEPURAÇÃO VIRAL CONTÍNUA. A presente invenção refere-se a um método para a validação de depuração viral contínua compreendendo as etapas de provisão de uma sonda a ser validada, enriquecimento da amostra de uma maneira válida, realização da depuração viral, amostragem da sonda enriquecida e análise da amostra da sonda enriquecida da etapa d).