

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 936 084**

51 Int. Cl.:

B01D 15/18 (2006.01)

B01D 15/12 (2006.01)

B01D 15/36 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2013 E 16181909 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2022 EP 3130384**

54 Título: **Purificación de moléculas biológicas**

30 Prioridad:

29.06.2012 US 201261666561 P
29.06.2012 US 201261666329 P
29.06.2012 US 201261666521 P
02.07.2012 EP 12004909

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2023

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

XENOPOULOS, ALEX;
PHILLIPS, MICHAEL;
MOYA, WILSON;
JABER, JAD;
KOZLOV, MIKHAIL;
POTTY, AJISH;
STONE, MATTHEW, T.;
CATALDO, WILLIAM y
GILLESPIE, CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 936 084 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

Purificación de moléculas biológicas

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona un proceso inventivo y eficiente para la purificación de una molécula diana a partir de un eluido de Proteína A.

10 Antecedentes de la invención

15 La producción eficiente y económica a gran escala de biomoléculas, por ejemplo, proteínas terapéuticas que incluyen anticuerpos, péptidos u hormonas, es una consideración cada vez más importante para las industrias biotecnológica y farmacéutica. Generalmente, los procesos de purificación son bastante elaborados y costosos, e incluyen muchas etapas diferentes.

20 Típicamente, las proteínas se producen mediante el uso de métodos de cultivo celular, por ejemplo, mediante el uso de líneas celulares de mamífero o bacterianas manipuladas genéticamente de forma recombinante para producir la proteína de interés. En general, después de la expresión de la proteína diana, su separación de una o más impurezas tales como, por ejemplo, proteínas de células huésped, componentes del medio y ácidos nucleicos, plantea un desafío formidable. Tal separación y purificación es especialmente importante si las proteínas terapéuticas se destinan al uso en humanos y deben ser aprobadas por agencias reguladoras, tal como la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA).

25 Los procesos convencionales usados hoy en día para la purificación de proteínas a menudo incluyen al menos las siguientes etapas: (a) una etapa de clarificación para la eliminación de células y residuos celulares, por ejemplo, mediante el uso de la centrifugación diferencial y/o filtración; y (b) una o más etapas posteriores de cromatografía para separar la proteína de interés de diversas impurezas en la alimentación de cultivo celular clarificado.

30 Mientras que los procesos de fermentación y cultivo celular se pueden ejecutar en un modo discontinuo o semicontinuo o de manera continua (por ejemplo, en forma de un proceso de perfusión continua), los procesos de purificación posteriores se ejecutan, típicamente, como procesos discontinuos que a menudo se separan incluso física y logísticamente. Entre cada etapa del proceso, la muestra se almacena, típicamente, en un tanque de depósito o de retención o reservorio para cambiar las condiciones de la solución y hacerla adecuada para la siguiente etapa del proceso. Por consiguiente, se requieren grandes recipientes para almacenar el producto intermedio. Esto conduce a altos costos y a una flexibilidad y movilidad de fabricación muy limitadas.

35 Además, la realización de una serie de etapas separadas del proceso discontinuo es laboriosa y costosa, así como también consume mucho tiempo.

40 En el caso de los anticuerpos monoclonales, el estándar de la industria para los procesos de purificación típicamente implica un proceso "modelo", que incluye varias operaciones unitarias. Una de las operaciones unitarias es una etapa de purificación que emplea un ligando de afinidad llamado Proteína A, aislado de *Staphylococcus aureus*, y que se une a la región Fc de los anticuerpos. Las operaciones unitarias adicionales suelen usarse junto con la operación unitaria de la Proteína A y la mayoría de las compañías biofarmacéuticas emplean modelos de proceso que son bastante similares en el uso de las operaciones unitarias, mientras que puede haber algunas variaciones en el orden de las operaciones unitarias.

45 En la Figura 1 se muestra un proceso modelo ilustrativo usado hoy en día en la industria. Los aspectos clave de este modelo son una etapa de cosecha de células, que típicamente implica el uso de centrifugación para eliminar las células y los residuos celulares de un caldo de cultivo celular, seguido de una filtración en profundidad. La etapa de cosecha de células suele ir seguida de una etapa de purificación por afinidad de Proteína A, a la que sigue la inactivación de virus. La inactivación de virus va seguida, típicamente, de una o más etapas cromatográficas, también denominadas etapas de pulido, que suelen incluir una o más de la cromatografía de intercambio catiónico y/o cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatografía de interacciones hidrófobas y/o cromatografía de modo mixto y/o cromatografía de hidroxipatita. Las etapas de pulido van seguidas de la filtración del virus y la ultrafiltración/diafiltración, que completa el proceso modelo. Véase, por ejemplo, Shukla y otros, J. Chromatography B., 848 (2007) 28-39; Liu y otros, MABs, 2010: septiembre a octubre 2(5): 480-499.

50 Generalmente, el efluente de las operaciones de filtración y el eluido de las operaciones cromatográficas se recolectan en tanques de depósito intermedios y se almacenan, a menudo durante toda la noche, hasta la siguiente operación unitaria. El tiempo necesario para completar este proceso puede ser de 4 a 7 días.

55 El documento WO2008/145351 se refiere a un método para purificar una inmunoglobulina.

60

La presente invención proporciona un proceso modelo mejorado que supera varias de las deficiencias de los procesos modelo que se usan actualmente en la industria.

Resumen de la invención

5

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

10

La presente invención proporciona un proceso que proporciona varias ventajas sobre los procesos modelo típicos que se usan hoy en día en la industria. El proceso modelo que se describe en la presente descripción incluye operaciones unitarias que se conectan de manera continua o semicontinua y evitan la necesidad de tanques de depósito (también llamados tanques de retención) entre determinadas operaciones unitarias, donde se usan, típicamente, tanques de retención. Alternativamente, solo se emplean tanques de compensación.

15

Debido a una combinación específica de determinadas etapas del proceso, el proceso descrito en la presente descripción requiere menos etapas que los procesos típicos usados en la industria y también reduce significativamente el tiempo del proceso de purificación general, sin tener un impacto adverso en el rendimiento del producto.

20

En algunas modalidades, el proceso de flujo continuo comprende además someter la muestra de flujo continuo de la etapa (c) a la filtración del virus

En algunas modalidades, el proceso de flujo continuo comprende además el uso de un mezclador estático en línea y/o un tanque de compensación entre las etapas (b) y (c) para cambiar el pH.

25

En algunas modalidades, el eluido de la columna de cromatografía de Proteína A se somete a la inactivación de virus antes de ponerse en contacto con el carbón activado.

En algunas modalidades, las etapas (a)-(c) pueden realizarse en cualquier orden.

30

En algunas modalidades, el proceso emplea un único patín.

Breve descripción de los dibujos

35

La Figura 1 es una representación esquemática de un proceso de purificación convencional usado en la industria.

40

La Figura 2 es una representación esquemática de un proceso de purificación ilustrativo, como se describe en la presente descripción. El proceso de purificación que se muestra usa un biorreactor para el cultivo celular seguido de las siguientes etapas del proceso: clarificación, cromatografía de unión y elución de Proteína A (captura); inactivación de virus; purificación de flujo continuo; y formulación. Como se muestra, cada una de las etapas del proceso emplea uno o más dispositivos que se usan para lograr el resultado deseado de la etapa del proceso. Como se muestra, la clarificación emplea la precipitación y filtración en profundidad; la cromatografía de unión y elución de Proteína A se realiza mediante el uso de una cromatografía continua de múltiples columnas (CMC); la inactivación de virus emplea dos mezcladores estáticos en línea; la purificación de flujo continuo emplea carbón activado (CA) seguido de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) seguido de un cambio de pH mediante el uso de un mezclador estático en línea y un tanque de compensación seguido de cromatografía de intercambio catiónico de flujo continuo (CEX) y la filtración del virus; y la formulación emplea un dispositivo de filtración de flujo tangencial de diafiltración/concentración seguido de filtración estéril. Uno o más filtros estériles también se emplean a lo largo del proceso.

50

La Figura 3 es un gráfico que representa los resultados de un experimento para medir la presión de cada filtro de profundidad (primario y secundario) y filtro estéril usado durante la etapa de clarificación del proceso de la Figura 2. Los ejes X indican la carga del filtro (l/m^2) y el eje X superior se refiere a la carga del filtro estéril y el eje X inferior se refiere a la carga de los dos filtros de profundidad; y el eje Y indica la presión en psi.

55

La Figura 4 es un gráfico que representa los resultados de un experimento para medir el avance de HCP y MAb después de la filtración en profundidad antes de la carga en la configuración de cromatografía continua de múltiples columnas (CMC) de Proteína A. El eje X indica la carga del filtro de profundidad (l/m^2), el eje Y izquierdo indica la concentración de MAb (mg/ml) y el eje Y derecho indica la concentración de HCP ($\mu g/ml$).

La Figura 5 es una representación esquemática de la etapa del proceso de purificación de flujo continuo, como se describe además en el Ejemplo 3.

60

La Figura 6 es un gráfico que representa los resultados de un experimento para medir los perfiles de presión después del filtro de profundidad, el carbón activado y la filtración del virus. El eje Y indica la presión (psi) y el eje X indica el tiempo en horas.

La Figura 7 es un gráfico que representa los resultados de un experimento para medir el avance de HCP después de la carga de la AEX. El eje Y indica la concentración de HCP (ppm) y el eje X indica la carga de la AEX (kg/l).

65

La Figura 8 es un gráfico que representa los resultados de un experimento para medir la eliminación de agregados de MAb en función de la carga del dispositivo de filtración de virus durante la operación de

purificación de flujo continuo. El eje X indica la carga de filtración de virus (kg/m^2) y el eje Y indica el porcentaje de agregados de MAb en la muestra después de la filtración de virus.

La Figura 9 es un gráfico que representa los resultados de un experimento para medir los perfiles de presión después del carbón activado y antes de la filtración de virus durante la operación de purificación de flujo continuo. El eje X indica el tiempo en horas y el eje Y indica la presión en psi.

La Figura 10 es un gráfico que representa los resultados de un experimento para medir los perfiles de pH y conductividad, donde el pH se mide antes del carbón activado y antes del dispositivo de flujo continuo CEX y la conductividad se mide antes del dispositivo de flujo continuo CEX. El eje Y izquierdo indica el pH, el eje Y de la derecha indica la conductividad (mS/cm) y el eje X indica el tiempo en horas.

La Figura 11 es un cromatograma para la captura de Proteína A del MAb04 clarificado sin tratar mediante el uso de la CMC que emplea dos unidades de separación.

La Figura 12 es un cromatograma para la captura de Proteína A del MAb04 clarificado con un polímero inteligente mediante el uso de la CMC que emplea dos unidades de separación.

La Figura 13 es un cromatograma para la captura de Proteína A del MAb04 clarificado con ácido caprílico mediante el uso de la CMC que emplea dos unidades de separación.

La Figura 14 es un gráfico que representa los resultados de un experimento para investigar el efecto del tiempo de residencia en la eliminación de HCP mediante el uso de carbón activado y un dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico (AEX), como parte de la operación de purificación de flujo continuo. El eje Y indica la concentración de HCP (ppm) y el eje X indica la carga de la AEX (kg/l).

La Figura 15 es un gráfico que representa los resultados de un experimento para medir el efecto sobre la subida del pH después de usar un tanque de compensación entre la cromatografía de intercambio aniónico de flujo continuo y la etapa de cromatografía de intercambio catiónico en una operación de purificación de flujo continuo. El eje X indica el pH y el eje Y indica el tiempo en horas.

La Figura 16 es una representación esquemática de la configuración experimental usada para demostrar que la ejecución de la operación de purificación de flujo continuo, de manera continua, no tiene un efecto perjudicial sobre la pureza del producto.

La Figura 17 es un gráfico que representa los resultados de un experimento para investigar los perfiles de presión después de la filtración de virus, mediante el uso de un dispositivo de filtración de virus en un formato continuo y en un modo discontinuo. El eje Y indica la presión en psi y el eje X indica el tiempo de procesamiento en horas.

La Figura 18 es un gráfico que representa los resultados de un experimento para investigar el efecto de la velocidad de flujo sobre la capacidad de procesamiento del dispositivo de filtración de virus. El eje Y indica la caída de presión (psi) y el eje X indica la capacidad de procesamiento del dispositivo de filtración de virus (kg/m^2).

La Figura 19 representa un cromatograma del Lote # 1712 con el MAb5 a pH 5,0 y un tiempo de residencia de 3 minutos. Como se representa en la Figura 19, la mayor parte del producto se recolecta en el flujo continuo y esto se indica por el avance, relativamente rápido, de la traza UV de proteína. El tamaño del pico de la franja generalmente varía en base a las condiciones y la masa total cargada, pero está relativamente enriquecido con especies de agregados en un 95,6 %, en comparación con el material de carga que tenía solo un 5,5 % de agregados.

La figura 20 es un gráfico que representa los picos de elución (primer pico entre 120 y 130 ml) y regeneración (alrededor de 140 ml) del cromatograma de purificación de Proteína A para el cultivo celular tratado con un polímero sensible al estímulo y/o NaCl. También se muestra el control sin ningún tratamiento. El eje X representa el volumen pasado a través de la columna de Proteína A y el eje Y representa la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm.

La Figura 21 es un gráfico de barras que representa el LRV de HCP en función de la concentración de NaCl usada en el lavado intermedio o en la etapa de carga durante la cromatografía de Proteína A. El eje X representa la concentración de NaCl en molar (M) y el eje Y representa el LRV de HCP.

La Figura 22 es un gráfico de barras que representa el porcentaje de recuperación del producto (MAb) en función de la concentración de NaCl en la etapa de lavado intermedio o en la etapa de carga durante la cromatografía de Proteína A. El eje X representa la concentración de NaCl en M y el eje Y representa el porcentaje de recuperación de MAb.

La Figura 23 es un gráfico de barras que representa la concentración de HCP en partes por millón (ppm) en función del aditivo incluido en la etapa de lavado intermedio o en la etapa de carga durante la cromatografía de Proteína A. El eje X representa el aditivo incluido y el eje Y representa la concentración de HCP en ppm .

La Figura 24 es un gráfico de barras que representa el LRV de HCP en función del aditivo incluido en la etapa de lavado intermedio o en la etapa de carga durante la cromatografía de Proteína A. El eje X representa el aditivo incluido y el eje Y representa el LRV de HCP.

La Figura 25 es un gráfico de barras que representa la relación entre el volumen de la mezcla de muestras de elución del aditivo y el volumen de la mezcla de muestras de elución del control en función del aditivo incluido en la etapa de lavado intermedio o en la etapa de carga durante la cromatografía de Proteína A. El eje X representa el aditivo incluido y el eje Y representa la relación entre el volumen de la mezcla de muestras de elución del aditivo y el volumen de la mezcla de muestras de elución del control.

Descripción detallada

La presente invención proporciona un proceso que supera varios inconvenientes asociados con los procesos modelo típicos usados en la industria para la purificación de moléculas biológicas tales como anticuerpos.

5 Como se discutió anteriormente, los procesos modelo típicos para la purificación de moléculas biológicas incluyen muchas etapas diferentes, que incluyen una o más etapas cromatográficas, requieren el uso de tanques de retención o depósito entre las etapas, así como también tardan varias horas o días en completarse.

10 Ha habido algunos esfuerzos para apartarse de un proceso modelo típico. Por ejemplo, en la publicación de patente del PCT núm. WO 2012/014183 se discuten los métodos para la purificación de proteínas en los que se combinan en tándem dos o más modos de separación cromatográfica. Además, en la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2008/0269468 se discute la combinación de un sistema de fermentación por perfusión continua con un sistema continuo de eliminación de partículas y un sistema continuo de purificación, donde la velocidad de flujo de la mezcla a través de todo el proceso se mantiene sustancialmente constante.

15 Además, en la publicación del PCT núm. WO2012/051147 se discuten los procesos para la purificación de proteínas, pero no parece describir un proceso continuo o semicontinuo.

20 Por último, la publicación del PCT núm. WO2012/078677 describe un proceso continuo para la fabricación de moléculas biológicas; sin embargo, parece depender de la utilización de conjuntos de múltiples válvulas. Además, la publicación del PCT mencionada anteriormente tampoco enseña ni sugiere el uso de todas las etapas del proceso descritas en la presente descripción. Por ejemplo, no parece haber ninguna enseñanza o sugerencia de una operación de purificación de flujo continuo que incluya múltiples etapas de flujo continuo que incluyen, por ejemplo, el uso de un dispositivo de flujo continuo de carbón activado, un medio AEX de flujo continuo, un medio CEX de flujo continuo y un filtro de virus de flujo continuo. De hecho, la publicación del PCT núm. WO2012/078677 no enseña ni sugiere una etapa de cromatografía de intercambio catiónico realizada en un modo de flujo continuo. Por último, la PCT mencionada anteriormente tampoco describe un proceso continuo que use una única etapa de cromatografía de unión y elución y que pueda realizarse satisfactoriamente con intervenciones mínimas, según los procesos descritos en la presente descripción.

30 Por lo tanto, aunque parece conveniente tener un proceso de purificación que se realice en un modo continuo, ha sido difícil lograr un proceso continuo eficiente debido a la complejidad asociada con la conexión de varias operaciones unitarias individuales para ejecutarse en un modo continuo, o incluso semicontinuo, con intervenciones mínimas, por ejemplo, menos ajustes de la solución (por ejemplo, cambios en el pH y/o conductividad). Sin embargo, la presente invención ha sido capaz de lograr exactamente eso.

35 La presente invención también proporciona otras ventajas sobre los procesos convencionales usados en la industria hoy en día, por ejemplo, reduce el número de etapas del proceso y evita la necesidad de usar grandes tanques de depósito entre las etapas del proceso para los ajustes en la solución. En el caso de los procesos y sistemas descritos en la presente descripción, no se requiere realizar diluciones de gran volumen para cambiar la conductividad, de esta manera se evita la necesidad de usar grandes tanques de depósito entre las etapas del proceso. Además, en algunas modalidades, los procesos descritos en la presente descripción emplean menos equipos de control/supervisión (también llamados "patines"), que se asocian, típicamente, con cada etapa única del proceso, en comparación con los procesos convencionales usados en la técnica.

45 En algunas modalidades, la presente descripción también proporciona procesos que emplean la inclusión de un aditivo durante la etapa de carga de la cromatografía de Proteína A, lo que resulta en la reducción o eliminación de una o más etapas de lavado intermedio al pasar directamente de la etapa de carga a la etapa de elución o al reducir el número de etapas de lavado entre la etapa de carga y la etapa de elución, sin sacrificar la pureza del producto. Mientras en la publicación de patente de Estados Unidos núm. 20130096284 se discute la inclusión de un aminoácido o sal en la muestra que se carga en una columna de cromatografía de Proteína A, la publicación anterior no parece enseñar o sugerir el uso de tal etapa de cromatografía de Proteína A en un modo continuo o semicontinuo de múltiples columnas, como se describe en la presente descripción. En su lugar, se discute la etapa Proteína A que debe realizarse en un modo discontinuo, de una única columna.

50 La presente descripción demuestra que, incluso tras la eliminación o reducción del número de etapas de lavado realizadas durante la etapa de cromatografía de Proteína A, se observa una reducción en el nivel de impurezas, por ejemplo, las HCP, sin sacrificar la pureza del producto.

60 Para que la presente descripción pueda entenderse más fácilmente, primero se definen determinados términos. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

Definiciones

65 Antes de describir la presente descripción en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a las etapas del proceso específicas, ya que pueden variar. Las etapas del proceso son como se definen en las reivindicaciones adjuntas. Debe señalarse que, como se usa en esta descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas

singulares "un", "una", y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un ligando" incluye una pluralidad de ligandos y la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de anticuerpos y similares.

5 A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica con la cual se relaciona esta invención.

10 Los siguientes términos se definen para los fines de la invención como se describe en la presente descripción.

10 Como se usa en la presente descripción, el término "molécula diana" o "compuesto diana" se refiere a cualquier molécula, sustancia o compuesto o mezclas de los mismos que se aísla, separa o purifica de una o más impurezas en una muestra mediante el uso de los procesos y sistemas descritos en la presente descripción. En diversas modalidades, la molécula diana es una molécula biológica tal como, por ejemplo, una proteína o una mezcla de dos o más proteínas. En una modalidad particular, la molécula diana es una proteína que contiene una región Fc tal como un anticuerpo.

15 El término "anticuerpo" se refiere a una proteína que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Típicamente, los anticuerpos tienen una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas que consiste de dos cadenas pesadas y dos ligeras, dichas cadenas se encuentran estabilizadas, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro entre las cadenas. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, los anticuerpos IgM que existen en forma pentamérica y/o los anticuerpos IgA que existen en forma monomérica, dimerica o multimérica. Los anticuerpos también pueden incluir anticuerpos de múltiples especificidades (por ejemplo, anticuerpos de dos especificidades) y fragmentos de anticuerpos, siempre que retengan o se modifiquen para que comprendan, un dominio de unión al ligando específico. El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos residuos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos pueden obtenerse a través del tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos también pueden obtenerse por medios recombinantes. Cuando se producen de forma recombinante, los fragmentos pueden expresarse solos o como parte de una proteína más grande llamada proteína de fusión. Los fragmentos ilustrativos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fc y/o Fv.

20 Una proteína que contiene una región Fc es una proteína recombinante que incluye la región Fc de una inmunoglobulina fusionada a otro polipéptido o a un fragmento del mismo. Las polipéptidos ilustrativos incluyen, por ejemplo, renina; una hormona del crecimiento, que incluye la hormona del crecimiento humano y la hormona del crecimiento bovina; factor liberador de hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; α -1-antitripsina; cadena α de la insulina; cadena β de la insulina; proinsulina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de la coagulación tales como el factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor von Willebrands; factores anticoagulantes tal como la proteína C; factor natriurético auricular; tensorio pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como urocinasa o el activador de plasminógeno de orina humana o de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético, factor de necrosis tumoral α y β ; encefalinasa; RANTES (regulado por activación, normalmente expresado y secretado por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1 α); una albúmina sérica tal como albúmina sérica humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena α de la relaxina; cadena β de la relaxina; prorrelinaxina; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como la β -lactamasa; ADNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; Proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, 4, 5 o 6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tales como α -FGF y β -FGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF-alfa y TGF- β , que incluyen TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF β 4 o TGF- β 5; factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP); proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana superficiales; factor de aceleración de la descomposición; antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del SIDA; proteínas de transporte; receptores de guiado; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente. Además, un anticuerpo que puede purificarse mediante el uso de los procesos descritos en la presente descripción puede unirse específicamente a cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

65 Como se usa en la presente descripción, y a menos que se indique de cualquier otra manera, el término "muestra" se refiere a cualquier composición o mezcla que contiene una molécula diana. Las muestras pueden derivar de

fuentes biológicas o de otro tipo. Las fuentes biológicas incluyen fuentes eucarióticas y procarióticas, tales como células, tejidos y órganos vegetales y animales. La muestra también puede incluir diluyentes, tampones, detergentes y especies contaminantes, residuos y similares que se encuentran mezclados con la molécula diana. La muestra puede estar "parcialmente purificada" (es decir, se ha sometido a una o más etapas de purificación, tales como etapas de filtración) o puede obtenerse directamente de una célula u organismo huésped que produce la molécula diana (por ejemplo, la muestra puede comprender fluido de cultivo celular cosechado). En algunas modalidades, una muestra es una alimentación de cultivo celular.

El término "impureza" o "contaminante", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier molécula extraña u objetable, que incluye una macromolécula biológica tal como ADN, ARN, una o más proteínas de células huésped, endotoxinas, lípidos y uno o más aditivos que pueden estar presentes en una muestra que contiene la molécula diana que se está separando de una o más de las moléculas extrañas u objetables mediante el uso de un proceso de la presente invención. Además, tal impureza puede incluir cualquier reactivo que se use en una etapa que pueda ocurrir antes del método de la invención. Una impureza puede ser soluble o insoluble en la naturaleza.

El término "impureza insoluble", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier entidad inconveniente u objetable presente en una muestra que contiene una molécula diana, donde la entidad es una partícula suspendida o un sólido. Las impurezas insolubles ilustrativas incluyen células enteras, fragmentos celulares y residuos celulares.

El término "impureza soluble", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier entidad inconveniente u objetable presente en una muestra que contiene una molécula diana, donde la entidad no es una impureza insoluble. Las impurezas solubles ilustrativas incluyen proteínas de la célula huésped (HCP), ADN, ARN, virus, endotoxinas, componentes de medios de cultivo celular, lípidos, etc.

Los términos "proteína de células de ovario de hámster chino" y "CHOP" se usan indistintamente para referirse a una mezcla de proteínas de células huésped ("HCP") derivadas de un cultivo de células de ovario de hámster chino ("CHO"). Las HCP o CHOP generalmente se presentan como una impureza en un medio o lisado de cultivo celular (por ejemplo, un fluido de cultivo celular cosechado ("HCCF")) que comprende una molécula diana tal como un anticuerpo o inmunoadhesina expresado en una célula CHO). La cantidad de CHOP presente en una mezcla que comprende una molécula diana proporciona una medida del grado de pureza de la molécula diana. La HCP o CHOP incluye, pero no se limita a, una proteína de interés expresada por la célula huésped, tal como una célula huésped CHO. Típicamente, la cantidad de CHOP en una mezcla de proteínas se expresa en partes por millón con relación a la cantidad de la molécula diana en la mezcla. Se entiende que cuando la célula huésped es otro tipo de célula, por ejemplo, una célula de mamífero además de CHO, *E. coli*, una levadura, una célula de insecto o una célula vegetal, HCP se refiere a las proteínas, distintas de la proteína diana, encontradas en un lisado de esa célula huésped.

El término "partes por millón" o "ppm" se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a una medida de la pureza de una molécula diana purificada mediante el uso de un proceso descrito en la presente descripción. Las unidades ppm se refieren a la cantidad de HCP o CHOP en nanogramos/miligramo por molécula diana en miligramos/mililitro (es decir, (CHOP ng/ml)/(molécula diana mg/ml), donde la molécula diana y las HCP están en solución).

Los términos "purificar", "purificación", "separar", "separación", "aislar", o "aislamiento", como se usan en la presente descripción, se refieren al aumento del grado de pureza de una molécula diana a partir de una muestra que comprende la molécula diana y una o más impurezas. Típicamente, el grado de pureza de la molécula diana aumenta al eliminar (total o parcialmente) al menos una impureza de la muestra.

Los términos "modo de unión y elución" y "proceso de unión y elución", como se usan en la presente descripción, se refieren a una técnica de separación en la cual al menos una molécula diana contenida en una muestra (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc) se une a una resina adecuada o medios (por ejemplo, un medio de cromatografía de afinidad o un medio de cromatografía de intercambio catiónico) y posteriormente se eluye.

Los términos "proceso de flujo continuo", "modo de flujo continuo" y "operación de flujo continuo", tal como se usan indistintamente en la presente descripción, se refieren a una técnica de separación en la cual al menos una molécula diana (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc o un anticuerpo) contenido en una preparación biofarmacéutica junto con una o más impurezas está destinado a fluir a través de un material, que suele unirse a una o más impurezas, donde la molécula diana no suele unirse (es decir, fluye a través).

El término "etapa del proceso" u "operación unitaria", como se usa indistintamente en la presente descripción, se refiere al uso de uno o más métodos o dispositivos para lograr un resultado determinado en un proceso de purificación. Los ejemplos de las etapas del proceso u operaciones unitarias que pueden emplearse en los procesos y sistemas descritos en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, clarificación, cromatografía de unión y elución, inactivación de virus, purificación de flujo continuo (que incluye el uso de dos o más medios seleccionados de carbón activado, intercambio aniónico e intercambio catiónico en un modo de flujo continuo) y formulación. Se entiende que cada una de las etapas del proceso u operaciones unitarias puede emplear más de un etapa o método

o dispositivo para lograr el resultado deseado de esa etapa del proceso u operación unitaria. Por ejemplo, en algunas modalidades, la etapa de clarificación y/o la operación de purificación de flujo continuo, como se describe en la presente descripción, puede emplear más de un etapa o método o dispositivo para lograr esa etapa del proceso u operación unitaria. En algunas modalidades, uno o más dispositivos que se usan para realizar una etapa del proceso u operación unitaria son dispositivos de un solo uso y pueden eliminarse y/o reemplazarse sin tener que reemplazar ningún otro dispositivo en el proceso o incluso tener que detener la ejecución de un proceso.

Como se usa en la presente descripción, el término "sistema" generalmente se refiere a la forma física de todo el proceso de purificación, que incluye dos o más dispositivos para realizar las etapas del proceso u operaciones unitarias, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, el sistema está encerrado en un entorno estéril.

Como se usa en la presente descripción, el término "unidad de separación" se refiere a un equipo o aparato, que puede usarse en una separación cromatográfica de unión y elución o una etapa de flujo continuo o una etapa de filtración. Por ejemplo, una unidad de separación puede ser una columna de cromatografía o un cartucho de cromatografía que se llena con una matriz adsorbente o un dispositivo cromatográfico que contiene un medio que tiene la funcionalidad apropiada. En algunas modalidades, de acuerdo con los procesos y sistemas descritos en la presente descripción, se usa una única etapa de cromatografía de unión y elución en el proceso de purificación que emplea dos o más unidades de separación. En una modalidad, las dos o más unidades de separación incluyen los mismos medios.

En diversas modalidades, los procesos y sistemas descritos en la presente descripción evitan la necesidad de usar, necesariamente, tanques de depósito, de esta manera se reduce significativamente el tiempo general para ejecutar un proceso de purificación, así como también el espacio físico total que ocupa el sistema. En consecuencia, en diversas modalidades de acuerdo con la presente invención, la salida de una etapa del proceso (u operación unitaria) es la entrada para la siguiente etapa (u operación unitaria) en el proceso y fluye directa y continuamente hacia la siguiente etapa del proceso (u operación unitaria), sin la necesidad de recolectar toda la salida de una etapa del proceso.

Como se usa en la presente descripción, el término "tanque de depósito" se refiere a cualquier contenedor, recipiente, reservorio, tanque o bolsa, que se usa generalmente entre etapas del proceso y tiene un tamaño/volumen para permitir la recolección de todo el volumen de salida de una etapa del proceso. Los tanques de depósito pueden usarse para retener o almacenar o manipular las condiciones de la solución de todo el volumen de salida de una etapa del proceso. En diversas modalidades de acuerdo con la presente descripción, los procesos y sistemas descritos en la presente descripción evitan la necesidad de usar uno o más tanques de depósito.

En algunas modalidades, los procesos y sistemas descritos en la presente descripción pueden usar uno o más tanques de compensación a lo largo de un proceso de purificación.

El término "tanque de compensación", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier contenedor o recipiente o bolsa, que se usa entre las etapas del proceso o dentro de una etapa del proceso (por ejemplo, cuando una única operación del proceso comprende más de una etapa); donde la salida de una etapa fluye a través del tanque de compensación a la etapa siguiente. En consecuencia, un tanque de compensación es diferente de un tanque de depósito, en el sentido de que no está destinado a retener o recolectar todo el volumen de salida de una etapa; pero en su lugar permite un flujo continuo de salida de una etapa a la siguiente. En algunas modalidades, el volumen de un tanque de compensación usado entre dos etapas del proceso o dentro de una operación del proceso (por ejemplo, operación de purificación de flujo continuo) descrito en la presente descripción, no es más del 25 % del volumen total de salida de la etapa del proceso. En otra modalidad, el volumen de un tanque de compensación no es más de 10 % del volumen total de salida de una etapa del proceso. En algunas otras modalidades, el volumen de un tanque de compensación es menor que el 35 %, o menor que el 30 %, o menor que el 25 %, o menor que el 20 %, o menor que el 15 %, o menor que el 10 % del volumen total de un cultivo celular en un biorreactor, que constituye el material de partida a partir del cual se purifica una molécula diana.

El término "proceso continuo", como se usa en la presente descripción, se refiere a un proceso para purificar una molécula diana, que incluye dos o más etapas del proceso (u operaciones unitarias), de modo que la salida de una etapa del proceso fluye directamente hacia la siguiente etapa del proceso en el proceso, sin interrupción y/o sin la necesidad de recolectar todo el volumen de la salida de una etapa del proceso antes de realizar la siguiente etapa del proceso. En una modalidad, pueden realizarse dos o más etapas del proceso simultáneamente durante al menos una porción de su duración. En otras palabras, en el caso de un proceso continuo, como se describe en la presente descripción, no es necesario completar una etapa del proceso antes de que comience la siguiente etapa del proceso, pero una porción de la muestra siempre está en movimiento a través de las etapas del proceso. El término "proceso continuo" también se aplica a las etapas dentro de una operación del proceso, en cuyo caso, durante el desempeño de una operación del proceso que incluye múltiples etapas, la muestra fluye continuamente a través de las múltiples etapas que son necesarias para realizar la operación del proceso. Un ejemplo de tal operación del proceso descrito en la presente descripción es la operación de purificación de flujo continuo que incluye múltiples etapas que se realizan de manera continua y emplea dos o más de carbón activado de flujo continuo, medio AEX de

flujo continuo, medio CEX de flujo continuo, y filtración de virus de flujo continuo. En una modalidad, la operación de purificación de flujo continuo se lleva a cabo en el orden: carbón activado seguido de medio AEX seguido de medio CEX seguido de filtración de virus. Sin embargo, se entiende que el carbón activado, los medios AEX y los medios CEX pueden usarse en cualquier orden. En consecuencia, en algunas modalidades, la AEX va seguida de carbón activado seguido de medio CEX; o alternativamente, la CEX va seguida por carbón activado seguido por medio AEX. En otras modalidades más, el carbón activado va seguido de medio CEX seguido de medio AEX. En aún otras modalidades, el medio AEX va seguido del medio CEX seguido por carbón activado; o alternativamente, el medio CEX va seguido por medio AEX seguido por carbón activado.

Los procesos continuos, como se describe en la presente descripción, también incluyen procesos en los que la entrada del material fluido en cualquier etapa del proceso única, o la salida, es discontinua o intermitente. Tales procesos también pueden denominarse procesos "semicontinuos". Por ejemplo, en algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la entrada en una etapa del proceso (por ejemplo, una etapa de cromatografía de unión y elución) puede cargarse continuamente; sin embargo, la salida puede recolectarse de forma intermitente, donde las otras etapas del proceso en el proceso de purificación son continuas. En consecuencia, en algunas modalidades, los procesos y sistemas descritos en la presente descripción incluyen al menos una operación unitaria que se opera de manera intermitente, mientras que las otras operaciones unitarias en el proceso o sistema pueden operarse de manera continua.

El término "proceso conectado" se refiere a un proceso para purificar una molécula diana, donde el proceso comprende dos o más etapas del proceso (u operaciones unitarias), que se conectan para estar en comunicación fluida directa entre sí, de modo que el material fluido fluya continuamente a través de las etapas del proceso en el proceso y esté en contacto simultáneo con dos o más etapas del proceso durante la operación normal del proceso. Se entiende que a veces, al menos una etapa del proceso en el proceso puede aislarse temporalmente de las otras etapas del proceso mediante una barrera, tal como una válvula en la posición cerrada. Este aislamiento temporal de las etapas individuales del proceso puede ser necesario, por ejemplo, durante el inicio o apagado del proceso o durante la eliminación/reemplazo de las operaciones unitarias individuales. El término "proceso conectado" también se aplica a las etapas dentro de una operación del proceso que se conectan para estar en comunicación fluida entre sí, por ejemplo, cuando una operación de proceso requiere que se realicen varias etapas para lograr el resultado deseado de la operación (por ejemplo, la operación de purificación de flujo continuo usada en los métodos descritos en la presente descripción).

El término "comunicación fluida", como se usa en la presente descripción, se refiere al flujo de material fluido entre dos etapas del proceso o al flujo de material fluido entre las etapas del proceso de una operación del proceso, donde las etapas del proceso se conectan por cualquier medio adecuado (por ejemplo, una línea de conexión o tanque de compensación), de esta manera se permite el flujo de fluido de una etapa del proceso a otra etapa del proceso. En algunas modalidades, una línea de conexión entre dos operaciones unitarias puede interrumpirse por una o más válvulas para controlar el flujo de fluido a través de la línea de conexión. Una línea de conexión puede tener la forma de un tubo, una manguera, una tubería, un canal o algún otro medio que permita el flujo de líquido entre dos etapas del proceso.

Los términos "clarificar", "clarificación" y "etapa de clarificación", como se usan en la presente descripción, se refieren a una etapa del proceso para eliminar partículas suspendidas y/o coloides, de esta manera se reduce la turbidez, de una solución que contiene la molécula diana, medida en NTU (unidades nefelométricas de turbidez). La clarificación puede lograrse mediante una variedad de medios, que incluyen la centrifugación o filtración. La centrifugación puede hacerse en modo discontinuo o continuo, mientras que la filtración podría hacerse en un flujo normal (por ejemplo, filtración en profundidad) o en un modo de flujo tangencial. En los procesos usados en la industria hoy en día, la centrifugación va seguida, típicamente, por la filtración en profundidad, destinada a eliminar las impurezas insolubles, que pueden no haberse eliminado mediante centrifugación. Además, pueden usarse métodos para mejorar la eficiencia de la clarificación, por ejemplo, la precipitación. La precipitación de impurezas puede realizarse por diversos medios, tales como la floculación, el ajuste del pH (precipitación ácida), los cambios de temperatura, el cambio de fase debido a polímeros o moléculas pequeñas sensibles al estímulo, o cualquier combinación de estos métodos. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la clarificación implica cualquiera de las combinaciones de dos o más de centrifugación, filtración, filtración en profundidad y precipitación. En algunas modalidades, los procesos y sistemas descritos en la presente descripción evitan la necesidad de centrifugación.

El término "precipitar", "precipitado" o "precipitación" como se usa en la presente descripción, se refiere al proceso usado en la clarificación, en el que las propiedades de las impurezas inconvenientes se modifican de modo que puedan separarse más fácilmente de la molécula diana soluble. Esto se realiza, típicamente, mediante la formación de grandes partículas agregadas y/o complejos insolubles que contienen las impurezas inconvenientes. Estas partículas tienen propiedades (por ejemplo, densidad o tamaño) de modo que pueden separarse más fácilmente de la fase líquida que contiene la molécula diana soluble, tal como mediante filtración o centrifugación. En algunos casos, se efectúa un cambio de fase, de modo que las impurezas inconvenientes pueden separarse más fácilmente de la molécula diana soluble. La precipitación por cambio de fase puede lograrse mediante la adición de un agente precipitante, tal como un polímero o una molécula pequeña. En una modalidad particular, el precipitante es un

- 5 polímero sensible al estímulo, también denominado polímero inteligente. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el precipitante o agente precipitante es un floculante. La floculación, como se usa en la presente descripción, es una forma de realizar la precipitación donde el desempeño depende, típicamente, de la concentración de floculante usada ("dependiente de la dosis"). Los agentes floculantes típicos son los polielectrolitos, tales como los policationes, que forman complejos con impurezas con carga opuesta.
- 10 En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la clarificación emplea la adición de un precipitante a una muestra que contiene una molécula diana y una o más impurezas. En algunos casos, puede usarse un cambio en las condiciones de la solución (tales como temperatura, pH, salinidad) para iniciar la precipitación, tal como en el caso de los polímeros sensibles al estímulo. El material precipitado que contiene una o más impurezas, así como también el agente precipitante, se elimina posteriormente, de esta manera se recupera la molécula diana en la fase líquida, donde el líquido luego se somete, típicamente, a etapas adicionales del proceso para purificar adicionalmente la molécula diana.
- 15 La precipitación puede realizarse directamente en un biorreactor que contiene un cultivo celular que expresa una molécula diana a purificar, donde se añade un precipitante directamente al biorreactor. Alternativamente, el precipitante puede añadirse al cultivo celular, que típicamente contiene la molécula diana, en un recipiente separado.
- 20 En algunas modalidades, el precipitante se añade mediante el uso de un mezclador estático. En caso de que el precipitante sea un polímero sensible al estímulo, tanto el polímero como el estímulo al cual es sensible, pueden añadirse mediante el uso de un mezclador estático.
- 25 Los expertos en la técnica conocen muchas maneras de eliminar el material precipitado, tales como la centrifugación, filtración o sedimentación o cualquier combinación de las mismas.
- El término "sedimentación", como se usa en la presente descripción, se refiere a un proceso de sedimentación en el cual el material precipitado migra al fondo de un recipiente bajo la influencia de fuerzas gravitacionales. La sedimentación puede ir seguida por la decantación o filtración de la fase líquida o el sobrenadante.
- 30 Los términos "estímulo" o "estímulos", como se usan indistintamente en la presente descripción, se refieren a un cambio físico o químico en el entorno que resulta en una respuesta de un polímero sensible al estímulo. En consecuencia, tales polímeros son sensibles a un estímulo y el estímulo resulta en un cambio en la solubilidad del polímero. Los ejemplos de estímulos a los que son sensibles uno o más polímeros usados en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, cambios en la temperatura, cambios en la conductividad y/o cambios en el pH. En algunas modalidades, un estímulo comprende la adición a una muestra de un agente complejante o una sal que forma complejos. En diversas modalidades, generalmente se añade un estímulo después de la adición de un polímero a una muestra. Aunque el estímulo también puede añadirse durante o antes de la adición de un polímero a una muestra.
- 40 El término "polímero sensible al estímulo", como se usa en la presente descripción, se refiere a un polímero o copolímero que exhibe un cambio en una propiedad física y/o química después de la adición de un estímulo. Una respuesta típica a un estímulo es un cambio en la solubilidad del polímero. Por ejemplo, el polímero poli(N-isopropilacrilamida) es soluble en agua a temperaturas por debajo de alrededor de 35 °C, pero se vuelve insoluble en agua a temperaturas de alrededor de 35 °C. En una modalidad particular, un polímero sensible al estímulo es un polímero de polialilamina modificada (PAA) que es sensible a un estímulo de iones multivalentes (por ejemplo, estímulo de fosfato). Pueden encontrarse detalles adicionales sobre este polímero, por ejemplo, en la publicación de Estados Unidos núm. 20110313066.
- 45 En algunas modalidades, un cultivo celular se somete a un filtro de profundidad para eliminar una o más impurezas.
- 50 Los términos "filtro de profundidad" o "filtración en profundidad", como se usan en la presente descripción, se refieren a un filtro que es capaz de retener partículas a lo largo del medio del filtro, en lugar de solo en la superficie del filtro. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, se usan uno o más filtros de profundidad en la etapa del proceso de clarificación.
- 55 En algunas modalidades, la clarificación resulta en la eliminación de impurezas solubles y/o insolubles en una muestra, lo que más tarde puede resultar en el ensuciamiento del filtro o dispositivo usado en una etapa del proceso en un proceso de purificación, de esta manera el proceso de purificación general se hace más económico.
- 60 En diversas modalidades descritas en la presente descripción, se incluyen uno o más etapas de cromatografía en un proceso de purificación de proteínas.
- 65 El término "cromatografía" se refiere a cualquier tipo de técnica que separa un analito de interés (por ejemplo, una molécula diana) de otras moléculas presentes en una mezcla, a través de la adsorción diferencial a un medio. Por lo general, la molécula diana se separa de otras moléculas como resultado de las diferencias en las velocidades a las

que las moléculas individuales de la mezcla migran a través de un medio estacionario bajo la influencia de una fase móvil, o en procesos de unión y elución.

5 El término "matriz", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier tipo de sorbente en partículas, perla, resina u otra fase sólida (por ejemplo, una membrana, material no tejido, monolito, etc.) que, por lo general, tiene un grupo funcional o ligando unido a este. Una matriz que tiene un ligando o un grupo funcional unido a ella se denomina "medio", que en un proceso de separación actúa como adsorbente para separar una molécula diana (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc, tal como una inmunoglobulina) de otras moléculas presentes en una mezcla (por ejemplo, una o más impurezas) o, alternativamente, actúa como un tamiz para separar las
10 moléculas en base al tamaño (por ejemplo, en el caso de una membrana de filtración de virus).

Los ejemplos de materiales para formar la matriz incluyen polisacáridos (tales como agarosa y celulosa); y otras sustancias estables mecánicamente tales como sílice (por ejemplo, vidrio de poro controlado), poli(estireno-divinilbenceno), poli(acrilamida), partículas cerámicas y derivados de cualquiera de los anteriores. En una modalidad particular, se usa como matriz un polímero de poliviniléter hidrófilo rígido.
15

Puede que determinados medios no contengan ligandos. Los ejemplos de medios que pueden usarse en los procesos descritos en la presente descripción que no contienen un ligando incluyen, pero no se limitan a, carbón activado, hidroxiapatita, sílice, etc.
20

El término "ligando", como se usa en la presente descripción, se refiere a un grupo funcional que se une a una matriz y que determina las propiedades de unión del medio. Los ejemplos de "ligandos" incluyen, pero no se limitan a, grupos de intercambio iónico, grupos de interacciones hidrófobas, grupos de interacciones hidrófilas, grupos de interacciones tiofílicas, grupos de afinidad metálica, grupos de afinidad, grupos de bioafinidad y grupos de modo mixto (combinaciones de los mencionados anteriormente). Otros ejemplos de ligandos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, grupos de intercambio catiónico fuertes, tales como sulfopropilo, ácido sulfónico; grupos de intercambio aniónico fuertes, tales como cloruro de trimetilamonio; grupos de intercambio catiónico débiles, tales como ácido carboxílico; grupos de intercambio aniónico débiles, tales como N,N dietilamino o DEAE; grupos de interacciones hidrófobas, tales como fenilo, butilo, propilo, hexilo; y grupos de afinidad, tales como Proteína A, Proteína G y Proteína L. En una modalidad particular, el ligando que se usa en los procesos y sistemas descritos en la presente descripción incluye uno o más dominios de Proteína A o una variante funcional o fragmento de la misma, como se describe en las publicaciones de patentes de Estados Unidos núm. 201002218442 y 20130046056, que se relacionan con ligandos basados en formas multiméricas de tipo salvaje de los dominios B, Z o C o en variantes multiméricas de dominios de Proteína A (por ejemplo, pentámeros de los dominios B, Z o C). Los ligandos descritos allí también exhiben una unión de Fab reducida.
25
30
35

El término "cromatografía de afinidad" se refiere a una técnica de separación de proteínas en la que una molécula diana (por ejemplo, una proteína de interés que contiene una región Fc o un anticuerpo) se une específicamente a un ligando que es específico para la molécula diana. Tal ligando generalmente se une covalentemente a un material de matriz de cromatografía adecuado y es accesible a la molécula diana en solución cuando la solución se pone en contacto con los medios de cromatografía. En una modalidad particular, el ligando es la Proteína A o una variante funcional de la misma, inmovilizada sobre una matriz de polímero de poliviniléter hidrófilo rígido. La molécula diana generalmente retiene su afinidad de unión específica por el ligando durante las etapas cromatográficas, mientras que otros solutos y/o proteínas en la mezcla no se unen de manera apreciable o específica al ligando. La unión de la molécula diana al ligando inmovilizado permite que las proteínas e impurezas contaminantes pasen a través de la matriz de cromatografía mientras que la molécula diana permanece unida específicamente al ligando inmovilizado en el material en fase sólida. La molécula diana unida específicamente se elimina luego en su forma activa del ligando inmovilizado en condiciones adecuadas (por ejemplo, pH bajo, pH alto, alta concentración de sales, ligando competidor, etc.), y se pasa a través de la columna cromatográfica con el tampón de elución, sustancialmente libre de proteínas e impurezas contaminantes, a las que anteriormente se les permitió pasar a través de la columna. Se entiende que puede usarse cualquier ligando adecuado para purificar su proteína de unión específica respectiva, por ejemplo, un anticuerpo.
40
45
50

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Proteína A se usa como ligando para purificar una proteína diana que contiene una región Fc. Las condiciones para la elución de la molécula diana (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc) del ligando (por ejemplo, basado en la Proteína A) pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica. En algunas modalidades, la Proteína G o la Proteína L o una variante funcional de las mismas, pueden usarse como un ligando. En algunas modalidades, un proceso que emplea un ligando, tal como la Proteína A, usa un intervalo de pH de 5-9 para unirse a una proteína que contiene una región Fc, seguido del lavado o reequilibrio del conjugado ligando/molécula diana, a lo que sigue luego la elución con un tampón que tiene un pH de alrededor de, o por debajo de 4 y que contiene al menos una sal.
55
60

Los términos "Proteína A" y "Prot A" se usan indistintamente en la presente descripción y abarcan la Proteína A recuperada de una fuente nativa de la misma, la Proteína A producida sintéticamente (por ejemplo, por síntesis de péptidos o por técnicas recombinantes) y variantes de las mismas que retienen la capacidad de unirse a proteínas que tienen una región CH₂/CH₃, tal como una región Fc. La Proteína A puede adquirirse comercialmente de
65

Repligen, GE o Fermatech. La Proteína A generalmente se inmoviliza en una matriz de cromatografía. Un derivado, fragmento o variante funcional de la Proteína A usada en los métodos y sistemas de acuerdo con la presente descripción puede caracterizarse por una constante de unión de al menos $K=10^{-8}$ M, y preferentemente $K=10^{-9}$ M, para la región Fc de la IgG2a de ratón o la IgG1 humana. Una interacción que cumple con tal valor para la constante de unión se denomina "unión de alta afinidad" en el presente contexto. En algunas modalidades, tales derivados o variantes funcionales de la Proteína A comprenden al menos parte de un dominio funcional de unión a IgG de la Proteína A de tipo salvaje, seleccionada a partir de los dominios naturales E, D, A, B, C o mutantes, manipulados genéticamente, de la misma que retienen la funcionalidad de unión a IgG.

5

Además, los derivados de Proteína A o las variantes manipuladas genéticamente para permitir una unión de un solo punto a un soporte sólido pueden usarse también en la etapa de cromatografía de afinidad en los métodos reivindicados.

10

La unión a un solo punto generalmente significa que el resto de la proteína se une a través de un enlace covalente único a un material de soporte cromatográfico de la cromatografía de afinidad de Proteína A. Tal unión a un solo punto puede ocurrir también mediante el uso de residuos adecuadamente reactivos que se colocan en una posición expuesta de aminoácidos, concretamente en un bucle, cerca del extremo N o C o en cualquier otro lugar en la circunferencia externa del pliegue proteico. Los grupos reactivos adecuados son, por ejemplo, funciones sulfhidrilo o amino.

15

En algunas modalidades, los derivados de la Proteína A de las variantes se unen a través de una unión de múltiples puntos a una matriz de cromatografía adecuada.

20

El término "matriz de cromatografía de afinidad", como se usa en la presente descripción, se refiere a una matriz de cromatografía que porta ligandos adecuados para la cromatografía de afinidad. Típicamente, el ligando (por ejemplo, la Proteína A o una variante o fragmento funcional de la misma) se une covalentemente a un material de matriz de cromatografía y es accesible a la molécula diana en solución cuando la solución se pone en contacto con el medio de cromatografía. Un ejemplo de un medio de cromatografía de afinidad es un medio de Proteína A. Un medio de cromatografía de afinidad se une típicamente a las moléculas diana con alta especificidad en base a un mecanismo de llave/cerradura, tal como la unión antígeno/anticuerpo o enzima/receptor. Ejemplos de medios de afinidad que portan ligandos de Proteína A incluyen Proteína A SEPHAROSE™ y PROSEP®-A. En los procesos y sistemas descritos en la presente descripción, puede usarse una etapa de cromatografía de afinidad como la única etapa de cromatografía de unión y elución en todo el proceso de purificación. En una modalidad particular, un ligando basado en la Proteína A se une a una matriz de polímero de poliviniléter hidrófilo rígido. En otras modalidades, tal ligando se une a agarosa o a vidrio de poro controlado.

25

30

35

Los términos "intercambio iónico" y "cromatografía de intercambio iónico", como se usan en la presente descripción, se refieren al proceso cromatográfico en el cual un soluto o analito de interés (por ejemplo, una molécula diana que se purifica) en una mezcla, interactúa con un compuesto cargado enlazado (tal como mediante unión covalente) a un material de intercambio iónico en fase sólida, de modo que el soluto o analito de interés interactúa de manera inespecífica con el compuesto cargado más o menos que las impurezas o contaminantes del soluto en la mezcla. Los solutos contaminantes en la mezcla eluyen a partir de una columna del material de intercambio iónico más rápido o más lento que el soluto de interés o están unidos o excluidos de la resina con respecto al soluto de interés.

40

La "cromatografía de intercambio iónico" incluye específicamente el intercambio catiónico, el intercambio aniónico y la cromatografía de intercambio iónico en modo mixto. Por ejemplo, la cromatografía de intercambio catiónico puede unir la molécula diana (por ejemplo, una proteína diana que contiene una región Fc) seguida de la elución (por ejemplo, mediante el uso de la cromatografía de intercambio catiónico de unión y elución o "CEX") o puede unir predominantemente las impurezas mientras que la molécula diana "fluye continuamente" de la columna (cromatografía de intercambio catiónico de flujo continuo FT-CIEX).

45

50

La cromatografía de intercambio aniónico puede unir la molécula diana (por ejemplo, una proteína diana que contiene una región Fc) seguida de la elución o puede unir predominantemente las impurezas mientras la molécula diana "fluye a través" de la columna, a lo que también se denomina cromatografía negativa. En algunas modalidades y como se demuestra en los Ejemplos expuestos en la presente descripción, la etapa de cromatografía de intercambio aniónico se realiza en un modo de flujo continuo.

55

El término "medio de intercambio iónico" se refiere a un medio cargado negativamente (es decir, un medio de intercambio catiónico) o cargado positivamente (es decir, un medio de intercambio aniónico). La carga puede proporcionarse al unir uno o más ligandos cargados a una matriz, por ejemplo, mediante enlace covalente. Alternativamente, o además, la carga puede ser una propiedad inherente de la matriz (por ejemplo, como es el caso de la sílice, que tiene una carga general negativa).

60

El término "medio de intercambio aniónico" se usa en la presente descripción para referirse a un medio cargado positivamente, por ejemplo, que tiene uno o más ligandos cargados positivamente, tales como grupos amino cuaternarios, unidos a la matriz. Los medios de intercambio aniónico disponibles comercialmente incluyen celulosa

65

DEAE, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ (GE Healthcare). Otros materiales ilustrativos que pueden usarse en los procesos y sistemas descritos en la presente descripción son Fractogel® EMD TMAE, Fractogel® EMD TMAE Hicap, Eshmuno® Q y Fractogel® EMD DEAE (EMD Millipore).

5 El término "medio de intercambio catiónico" se refiere a un medio cargado negativamente y que tiene cationes libres para el intercambio con cationes en una solución acuosa en contacto con la fase sólida del medio. Un ligando cargado negativamente unido a la fase sólida para formar el medio de intercambio catiónico puede, por ejemplo, ser un carboxilato o sulfonato. Los medios de intercambio catiónico disponibles comercialmente incluyen carboximetilcelulosa, sulfopropilo (SP) inmovilizado en agarosa (por ejemplo, SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ o
10 SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™, de GE Healthcare) y sulfonilo inmovilizado en agarosa (por ejemplo, S-SEPHAROSE FAST FLOW™ de GE Healthcare). Se prefieren Fractogel® EMD SO₃, Fractogel® EMD SE Hicap, Eshmuno® S y Fractogel® EMD COO (EMD Millipore).

15 El término "cromatografía de modo mixto", como se usa en la presente descripción, se refiere a un proceso que emplea una fase estacionaria de cromatografía que porta al menos dos tipos distintos de grupos funcionales, cada uno capaz de interactuar con una molécula de interés. La cromatografía de modo mixto generalmente emplea un ligando con más de un modo de interacción con una proteína diana y/o impurezas. El ligando típicamente incluye al menos dos sitios diferentes pero cooperativos que interactúan con la sustancia a unir. Por ejemplo, uno de estos sitios puede tener una interacción de tipo carga-carga con la sustancia de interés, mientras que el otro sitio puede tener una interacción de tipo aceptor-donante de electrones y/o interacciones hidrófobas y/o hidrófilas con la sustancia de interés. Los tipos de interacción donante-aceptor de electrones incluyen interacciones de enlace de hidrógeno, π - π , catión- π , transferencia de carga, dipolo-dipolo y dipolo inducido. Generalmente, en base a las diferencias de la suma de las interacciones, una proteína diana y una o más impurezas pueden separarse en una gama de condiciones.

25 El término "medio de intercambio iónico de modo mixto" o "medio de modo mixto" se refiere a un medio que está modificado covalentemente con restos catiónicos y/o aniónicos e hidrófobos. Un medio de intercambio iónico de modo mixto disponible comercialmente es BAKERBOND ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) que contiene grupos de intercambio catiónico débiles, una baja concentración de grupos de intercambio aniónico y ligandos hidrófobos unidos a una matriz de soporte en fase sólida de gel de sílice. Los materiales de intercambio catiónico de modo mixto tienen típicamente restos de intercambio catiónico e hidrófobos. Los materiales de intercambio catiónico de modo mixto adecuados son Capto® MMC (GE Healthcare) y Eshmuno® HCX (Merck Millipore).

35 Los materiales de intercambio aniónico de modo mixto tienen típicamente restos de intercambio aniónico e hidrófobos. Los materiales de intercambio aniónico de modo mixto adecuados son Capto® Adhere (GE Healthcare).

40 El término "cromatografía de interacciones hidrófobas" o "HIC", como se usa en la presente descripción, se refiere a un proceso para separar moléculas en base a su hidrofobicidad, es decir, su capacidad para adsorberse en superficies hidrófobas de soluciones acuosas. La HIC por lo general se diferencia de la cromatografía de fase inversa (RP) por las resinas HIC especialmente diseñadas que, típicamente, tienen una hidrofobicidad o densidad de ligandos hidrófobos más baja en comparación con las resinas RP.

45 La cromatografía HIC típicamente se basa en las diferencias en los grupos hidrófobos en la superficie de las moléculas de soluto. Estos grupos hidrófobos tienden a unirse a grupos hidrófobos en la superficie de una matriz insoluble. Debido a que la HIC emplea un entorno más polar y menos desnaturizante que la cromatografía líquida de fase inversa, se vuelve cada vez más popular para la purificación de proteínas, a menudo en combinación con la cromatografía de intercambio iónico o filtración en gel.

50 El término "avanzar", como se usa en la presente descripción, se refiere al momento, durante la carga de una muestra que contiene una molécula diana en una columna de cromatografía empaquetada o unidad de separación, cuando la molécula diana aparece por primera vez en la salida de la columna o unidad de separación. En otras palabras, el término "avanzar" es el momento en el que comienza la pérdida de la molécula diana.

55 Un "tampón" es una solución que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. Diversos tampones que pueden emplearse en dependencia, por ejemplo, del pH deseado del tampón, se describen en: Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975). Los ejemplos no limitantes de tampones incluyen tampones MES, MOPS, MOPSO, Tris, HEPES, fosfato, acetato, citrato, succinato y amonio, así como también las combinaciones de estos.

60 Al "cargar" una muestra en un dispositivo o una columna o una unidad de separación que contiene un medio adecuado, se usa un tampón para cargar la muestra que comprende la molécula diana y una o más impurezas en el dispositivo, la columna o la unidad de separación. En el modo de unión y elución, el tampón tiene una conductividad y/o un pH tales que la molécula diana se une al medio, mientras que, idealmente, todas las impurezas no se unen y fluyen a través de la columna. Mientras que, en un modo de flujo continuo, se usa un tampón para cargar la muestra que comprende la molécula diana y una o más impurezas en una columna o dispositivo o unidad de separación, en
65

donde el tampón tiene una conductividad y/o pH tales que la molécula diana no se une al medio y fluye a través de él, mientras que, idealmente, todas o la mayoría de las impurezas se unen al medio.

5 El término "aditivo", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier agente que se añade a una muestra que contiene una proteína diana antes de cargar la muestra en una matriz de cromatografía o durante la etapa de carga, donde la adición del agente elimina uno o más etapas de lavado o reduce el número de etapas de lavado que, de cualquier otra manera, están diseñadas para la eliminación de impurezas, para usarse posterior a la etapa de carga y antes de la elución de la proteína diana. Puede añadirse un único agente a una muestra antes o durante la carga o el número de agentes puede ser más de uno. Los aditivos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, sales, polímeros, tensioactivos o detergentes, disolventes, agentes caotrópicos y cualquier combinación de los mismos. En una modalidad particular, tal aditivo es la sal de cloruro de sodio.

15 Puede usarse un mezclador estático para poner en contacto la salida de la etapa de clarificación con un aditivo, donde el uso de un mezclador estático reduce significativamente el tiempo, lo que permite una conexión simplificada de la etapa de clarificación a la etapa de cromatografía de Proteína A.

El término "reequilibrio" se refiere al uso de un tampón para reacondicionar el medio antes de cargar la molécula diana. El mismo tampón usado para la carga puede usarse para el reequilibrio.

20 El término "lavado" o "lavar" un medio de cromatografía se refiere al paso de un líquido apropiado, por ejemplo, un tampón, a través o sobre el medio. Típicamente, el lavado se usa para eliminar los contaminantes unidos débilmente del medio antes de eluir la molécula diana y/o para eliminar la molécula diana no unida o débilmente unida después de la carga. En algunas modalidades, el tampón de lavado es diferente del tampón de carga. En otras modalidades, el tampón de lavado y el tampón de carga son los mismos. En una modalidad particular, se elimina una etapa de lavado o se reduce el número de etapas de lavado en un proceso de purificación mediante la alteración de las condiciones de la carga de la muestra.

30 En algunas modalidades, las etapas de lavado que se usan en los procesos descritos en la presente descripción emplean un tampón que tiene una conductividad de 20 mS/cm o menor y, en consecuencia, son diferentes de los tampones que se usan, típicamente, para la eliminación de impurezas, ya que esos, típicamente, tienen una conductividad superior a 20 mS/cm.

35 El término "conductividad" se refiere a la capacidad de una solución acuosa para conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En solución, la corriente fluye por transporte de iones. Por lo tanto, con un aumento de la cantidad de iones presentes en la solución acuosa, la solución tendrá una conductividad más alta. La unidad de medida de la conductividad es miliSiemens por centímetro (mS/cm o mS), y puede medirse mediante el uso de un conductímetro disponible comercialmente (por ejemplo, vendido por Orion). La conductividad de una solución puede alterarse mediante el cambio de la concentración de iones en ella. Por ejemplo, la concentración de un agente tampón y/o la concentración de una sal (por ejemplo, NaCl o KCl) en la solución puede alterarse para lograr la conductividad que se desea. En algunas modalidades, la concentración de sales de diversos tampones se modifica para lograr la conductividad que se desea. En algunas modalidades, en procesos en los que se añaden uno o más aditivos a una carga de muestra, si se usan posteriormente uno o más etapas de lavado, tales etapas de lavado emplean un tampón con una conductividad de alrededor de 20 mS/cm o menor.

45 El término "eluir" o "elución" se refiere a la eliminación de una molécula (por ejemplo, un polipéptido de interés o una impureza) de un medio de cromatografía mediante el uso o la alteración de determinadas condiciones de la solución, a través de la cual el tampón (denominado "tampón de elución") compite con la molécula de interés por los sitios del ligando en la resina de cromatografía. Un ejemplo no limitante es eluir una molécula de una resina de intercambio iónico mediante la alteración de la fuerza iónica del tampón que rodea el material de intercambio iónico, de modo que el tampón compita con la molécula por los sitios cargados en el material de intercambio iónico.

50 En algunas modalidades, el tampón de elución tiene un pH bajo (por ejemplo, tiene un pH en el intervalo de alrededor de 2 a alrededor de 5, o de alrededor de 3 a alrededor de 4) y que perturba las interacciones entre el ligando (por ejemplo, la Proteína A) y la proteína diana. Los tampones de elución ilustrativos incluyen tampones de fosfato, acetato, citrato y amonio, así como también las combinaciones de estos. En algunas modalidades, puede usarse un tampón de elución que tenga un pH alto (por ejemplo, un pH de alrededor de 9 o más alto). Los tampones de elución también pueden contener compuestos adicionales, por ejemplo, MgCl₂ (2 mM) para facilitar la elución.

60 En caso de que se desee la inactivación de virus (VI), puede usarse un tampón de inactivación de virus para inactivar determinados virus antes de eluir la molécula diana. En tales casos, típicamente, el tampón de inactivación de virus difiere del tampón de carga, ya que puede contener detergente/detergentes o tener diferentes propiedades (pH/conductividad/sales y sus cantidades). En algunas modalidades, la inactivación de virus se realiza antes de la etapa de cromatografía de unión y elución. En algunas modalidades, la inactivación de virus se realiza durante o después de la elución de una etapa de cromatografía de unión y elución. En algunas modalidades, la inactivación de virus se realiza en línea mediante el uso de un mezclador estático. En otras modalidades, la inactivación de virus emplea el uso de uno o más tanques de compensación.

65

El término "biorreactor", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier dispositivo o sistema fabricado o diseñado que soporta un entorno biológicamente activo. En algunos casos, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso de cultivo celular. Tal proceso puede ser aerobio o anaerobio. Los biorreactores de uso común son típicamente cilíndricos, varían en tamaño desde litros hasta metros cúbicos, y a menudo están hechos de acero inoxidable. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, un biorreactor está hecho de un material diferente al acero y es desechable o de un solo uso. Se contempla que el volumen total de un biorreactor puede ser cualquier volumen que varía entre 100 ml y hasta 10 000 litros o más, en dependencia de un proceso particular. En algunas modalidades de acuerdo con los procesos y sistemas descritos en la presente descripción, el biorreactor está conectado a una unidad de operación tal como un filtro de profundidad. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, un biorreactor se usa tanto para el cultivo celular como para la precipitación, donde puede añadirse un precipitante directamente a un biorreactor, de esta manera precipitan una o más impurezas.

El término "carbón activo" o "carbón activado", como se usa indistintamente en la presente descripción, se refiere a un material carbonoso que se ha sometido a un proceso para mejorar su estructura porosa. Los carbones activados son sólidos porosos con áreas superficiales muy altas. Se pueden derivar de una variedad de fuentes que incluyen carbón, madera, cáscara de coco, cáscaras de nuez y turba. El carbón activado se puede producir a partir de estos materiales mediante el uso de la activación física que implica el calentamiento bajo una atmósfera que se controla o la activación química mediante el uso de ácidos, bases, u oxidantes fuertes. Los procesos de activación producen una estructura porosa con altas áreas superficiales que le dan al carbón activado altas capacidades para la eliminación de impurezas. Los procesos de activación se pueden modificar para controlar la acidez de la superficie. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el carbón activado se usa en una etapa de purificación de flujo continuo, que típicamente sigue a una etapa de cromatografía de unión y elución o una etapa de inactivación de virus que, a su vez, sigue a la etapa de cromatografía de unión y elución. En algunas modalidades, el carbón activado se incorpora dentro de un medio de celulosa, por ejemplo, en una columna o algún otro dispositivo adecuado.

El término "mezclador estático" se refiere a un dispositivo para mezclar dos materiales fluidos, típicamente líquidos. El dispositivo generalmente consiste en elementos mezcladores contenidos en una carcasa cilíndrica (tubo). El diseño general del sistema incorpora un método para suministrar dos corrientes de fluidos al mezclador estático. A medida que las corrientes se mueven a través del mezclador, los elementos que no se mueven combinan continuamente los materiales. La mezcla completa depende de muchas variables, que incluyen las propiedades de los fluidos, el diámetro interno del tubo, el número de elementos mezcladores y su diseño, etc. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, se usan uno o más mezcladores estáticos a lo largo del proceso o sistema de purificación. En una modalidad particular, se usa un mezclador estático para poner en contacto la salida de la etapa de cromatografía de unión y elución con un agente de inactivación de virus (por ejemplo, un ácido o cualquier otro agente de inactivación de virus adecuado), donde el uso de un mezclador estático reduce significativamente el tiempo, que, de cualquier otra manera, sería necesario para realizar la inactivación efectiva del virus.

Procesos

Como se discutió anteriormente, la presente invención proporciona un proceso nuevo y mejorado para la purificación de una molécula diana a partir de un eluido de Proteína A. Los procesos descritos en la presente descripción son una gran mejora con respecto a los métodos existentes usados en la técnica, ya que reducen el marco de tiempo general requerido para la ejecución de un proceso (12-24 horas con respecto a varios días); incluyen menos etapas en relación con la mayoría de los procesos convencionales; reducen el espacio físico general de un proceso en virtud de tener menos operaciones unitarias y son más fáciles de ejecutar que un proceso convencional. Además, en algunas modalidades, los procesos de acuerdo con la presente invención emplean dispositivos que pueden ser desechables.

Los procesos de acuerdo con la presente invención incluyen varias etapas del proceso u operaciones unitarias que están destinadas a lograr un resultado deseado y donde las etapas del proceso (u operaciones unitarias) se conectan de modo que estén en comunicación fluida entre sí y, además, que dos o más etapas del proceso puedan realizarse simultáneamente durante al menos una parte de la duración de cada etapa del proceso. En otras palabras, un usuario no tiene que esperar a que se complete una etapa del proceso antes de ejecutar la siguiente etapa del proceso, pero un usuario puede iniciar una ejecución del proceso de modo que la muestra líquida que contiene la molécula diana fluya a través de las etapas del proceso de manera continua o semicontinua, lo que resulta en una molécula diana purificada. En consecuencia, la muestra que contiene la molécula diana típicamente está en contacto con más de una etapa del proceso u operación unitaria en el proceso en un momento dado.

Cada etapa del proceso (u operación unitaria) puede implicar el uso de uno o más dispositivos o métodos para realizar la etapa del proceso.

Los procesos descritos en la presente descripción son diferentes de los procesos convencionales usados en la industria, en que evitan la necesidad de usar tanques de depósito para retener, diluir, manipular y, a veces,

almacenar la salida de una etapa del proceso antes de que la salida se someta a la siguiente etapa del proceso. Por el contrario, los procesos descritos en la presente descripción permiten cualquier manipulación de la muestra en línea (por ejemplo, mediante el uso de un mezclador estático) o emplean el uso de tanques de compensación (que por lo general no representan más del 10 % o 20 % o 25 % del volumen total de la salida de una etapa del proceso) entre las etapas del proceso o, a veces, dentro de una operación del proceso (por ejemplo, cuando una operación del proceso emplea más de un método o dispositivo), de esta manera se reduce significativamente el tiempo general para realizar el proceso, así como también el espacio físico del sistema general para realizar el proceso. En una modalidad, los procesos descritos en la presente descripción no usan tanques de depósito sino solo tanques de compensación que tienen un volumen menor que el 25 %, preferentemente menor que el 10 %, del volumen de la salida de la etapa anterior.

Los procesos descritos en la presente descripción incluyen al menos tres etapas del proceso: clarificación, cromatografía de unión y elución y purificación de flujo continuo. Típicamente, la clarificación es la primera etapa seguida de la cromatografía de unión y elución seguida de la operación de purificación de flujo continuo. Los procesos pueden incluir etapas de proceso adicionales que incluyen, pero no se limitan a, inactivación de virus y formulación. Un aspecto importante de los procesos descritos en la presente descripción es que, independientemente del número de etapas, el proceso incluye solo una etapa de cromatografía de unión y elución.

Las diversas etapas del proceso se realizan de manera continua o semicontinua, como se describe en la presente descripción. Los siguientes son ejemplos de etapas del proceso que pueden usarse en un proceso continuo o semicontinuo, como se describe en la presente descripción. Se entiende que puede usarse cualquier combinación de las etapas del proceso que se muestran más abajo. En otras palabras, cualquier etapa del proceso bajo la Etapa 1 en la Tabla I, que aparece más abajo, puede combinarse con cualquier etapa del proceso bajo la Etapa 2 y/o cualquier etapa del proceso bajo la Etapa 3 y así sucesivamente. También se entiende que las etapas del proceso adicionales, que se describen en otra parte de la descripción, pueden combinarse o usarse en lugar de una o más de las etapas del proceso descritas en la Tabla I que aparece más abajo.

Tabla I

Etapa 1 Clarificación	Etapa 2 Cromatografía de unión y elución	Etapa 3 Inactivación de virus	Etapa 4 Purificación de flujo continuo	Etapa 5 Formulación
Precipitación en un recipiente seguida de filtración en profundidad	Cromatografía de unión y elución de Proteína A continua/semicontinua	Inactivación de virus en un tanque de compensación	Medios AEX de flujo continuo con o sin filtración de virus	Diafiltración y concentración seguidas de filtración estéril
Precipitación en un recipiente seguida de centrifugación	Cromatografía de unión y elución de Proteína A de lecho móvil simulado	Inactivación de virus mediante el uso de un mezclador estático	Medios AEX y medios CEX de flujo continuo con o sin filtración de virus	Concentración seguida de filtración estéril
Precipitación en un recipiente seguida de sedimentación y microfiltración del sobrenadante	Cromatografía de unión y elución de intercambio catiónico continua/semicontinua		Medios de carbón activado y medios AEX de flujo continuo con o sin filtración de virus	Diafiltración seguida de filtración estéril
Precipitación en un biorreactor seguida de filtración en profundidad	Cromatografía de unión y elución en modo mixto continua/semicontinua		Medios de carbón activado y medios AEX y medios CEX de flujo continuo con o sin filtración de virus	
Precipitación en un biorreactor seguida de centrifugación				
Precipitación en un biorreactor seguida de sedimentación y microfiltración del sobrenadante				

Las diversas etapas del proceso (u operaciones unitarias) se describen con más detalle a continuación.

5 El material de partida para el proceso de purificación suele ser una muestra que contiene una molécula diana que se va a purificar. Típicamente, se usa un cultivo celular que produce la molécula diana. Sin embargo, también pueden usarse muestras distintas de los cultivos celulares. Las muestras ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, cultivos de células de mamíferos transgénicas, cultivos de células de mamíferos no transgénicas, cultivos de células bacterianas, cultivos de tejidos, lotes de fermentación microbiana, extractos de plantas, biocombustibles, cultivos de agua de mar, cultivos de agua dulce, cultivos de aguas residuales, aguas residuales tratadas, aguas residuales sin tratar, cultivos de leche, hemocultivos y combinaciones de los mismos. Generalmente, las muestras contienen
10 diversas impurezas además de la molécula diana. Tales impurezas incluyen componentes de medios, células, residuos celulares, ácidos nucleicos, proteínas de células huésped, virus, endotoxinas, etc.

Clarificación

15 Típicamente, una de las primeras etapas del proceso (u operaciones unitarias) en los procesos y sistemas descritos en la presente descripción es la clarificación. La clarificación está destinada a separar una o más impurezas solubles y/o insolubles de la molécula diana. En algunos aspectos, las impurezas insolubles, como células y residuos celulares, se eliminan de la muestra, lo que resulta en un fluido clarificado que contiene la molécula diana en solución, así como también otras impurezas solubles. La clarificación típicamente se realiza antes de una etapa que
20 implica la captura de la molécula diana deseada. Otro aspecto clave de la clarificación es la eliminación de impurezas solubles y/o insolubles en una muestra que más tarde puede resultar en el ensuciamiento de un filtro estéril en un proceso de purificación, de esta manera el proceso de purificación general se hace más económico.

25 Como se usa en la industria hoy en día, la clarificación generalmente comprende la eliminación de células y/o residuos celulares y, típicamente, implica la centrifugación como primera etapa, seguida de una filtración en profundidad. Véase, por ejemplo, Shukla y otros, *J. Chromatography B*, 848 (2007): 28-39; Liu y otros, *MAB*, 2(5): 480-499 (2010).

30 En algunos aspectos preferidos descritos en la presente descripción, la clarificación evita la necesidad de usar centrifugación.

35 Por ejemplo, en algunos aspectos, donde el volumen inicial de la muestra de cultivo celular en un biorreactor es menor que 2000 litros o menor que 1000 litros o menor que 500 litros, la muestra de cultivo celular puede someterse solo a una filtración en profundidad o a la sedimentación y filtración en profundidad, sin necesidad de una centrifugación.

40 En algunos aspectos preferidos, el uso de la precipitación antes de la filtración en profundidad aumenta la capacidad de procesamiento y, por lo tanto, también aumenta la cantidad de volumen de muestra que puede procesarse sin necesidad de centrifugación. En otras palabras, en algunos casos, si pueden procesarse 1000 litros de una muestra solo mediante filtración en profundidad, mediante la combinación con la precipitación, un usuario puede procesar casi el doble de esa cantidad, es decir, 2000 litros.

45 Los filtros de profundidad se usan típicamente para eliminar una o más impurezas insolubles. Los filtros de profundidad son filtros que usan un medio de filtración poroso para retener partículas a lo largo del medio, en lugar de solo en la superficie del medio.

50 En algunos aspectos preferidos, se usa un filtro de profundidad para la clarificación, que es capaz de filtrar los residuos celulares y partículas que tiene una distribución de tamaño de partícula de alrededor de 0,5 μm a alrededor de 200 μm a una velocidad de flujo de alrededor de 10 litros/ m^2/h a alrededor de 100 litros/ m^2/h .

55 Se ha encontrado que pueden lograrse resultados especialmente buenos en la eliminación primaria de impurezas de partículas si el filtro de profundidad poroso es anisótropo (es decir, con una reducción gradual en el tamaño de los poros). En algunos aspectos preferidos, los poros tienen una clasificación de tamaño de poro nominal > alrededor de 25 μm . En algunos aspectos preferidos, el filtro de profundidad comprende al menos 2 capas graduadas de fibras no tejidas, en donde las capas graduadas tienen un espesor total de alrededor de 0,3 cm a alrededor de 3 cm.

60 En algunos aspectos, los filtros de profundidad se configuran en un dispositivo que es capaz de filtrar alimentos con alto contenido de sólidos que contienen partículas que tienen una distribución de tamaño de partícula de aproximadamente 0,5 μm hasta 200 μm a una velocidad de flujo de alrededor de 10 litros/ m^2/h a alrededor de 100 litros/ m^2/h hasta que la presión transmembrana (TMP) alcanza 20 psi.

65 En algunos aspectos, los filtros de profundidad comprenden un compuesto de capas graduadas de fibras no tejidas, celulosa y tierra de diatomeas. Las fibras no tejidas comprenden polipropileno, polietileno, poliéster, nailon o mezclas de los mismos.

5 Pueden encontrarse filtros de profundidad ilustrativos y los métodos de uso de los mismos en la publicación de
patente de Estados Unidos núm. 20130012689, que son particularmente útiles para filtrar muestras que contienen
partículas que tienen una distribución de tamaño de alrededor de 0,5 µm a 200 µm. En consecuencia, en algunos
aspectos, los filtros de profundidad usados en la etapa de clarificación incluyen capas graduadas abiertas, lo que
permite que las partículas más grandes en la corriente de alimentación penetren hacia la profundidad del filtro y
queden capturadas dentro de los poros del filtro en lugar de acumularse en la superficie. Las capas superiores
abiertas de los filtros de profundidad graduada permiten capturar partículas más grandes, mientras que las capas
inferiores permiten capturar las partículas agregadas residuales más pequeñas. Diversas ventajas de los filtros de
profundidad graduada incluyen una mayor capacidad de procesamiento, la retención de sólidos más grandes y la
eliminación del problema de la formación de tortas.

15 Como se discutió anteriormente, en algunos aspectos, la clarificación incluye el uso de la filtración en profundidad
después de la precipitación. La precipitación puede emplear la precipitación ácida, uso de un polímero sensible al
estímulo, floculación o sedimentación y cualquier otro medio/agente adecuado para lograr la precipitación. En
consecuencia, en algunos aspectos, se añade a una muestra un precipitante, por ejemplo, un polímero sensible al
estímulo, para precipitar una o más impurezas solubles y/o insolubles antes de la filtración en profundidad.

20 Otros medios de precipitación incluyen, pero no se limitan a, el uso de ácidos grasos de cadena corta como el ácido
caprílico, el uso de floculantes, el cambio de las condiciones de la solución (por ejemplo, temperatura, pH, salinidad)
y la precipitación ácida. Por ejemplo, se ha informado que, en condiciones ligeramente ácidas, la adición de ácidos
grasos de cadena corta, tal como el ácido caprílico, típicamente precipita proteínas que no son IgG, mientras que las
IgG no precipitan.

25 La floculación, como se usa en la presente descripción, es una forma de realizar la precipitación donde la
precipitación depende típicamente de la concentración de floculante usada (es decir, es "dependiente de la dosis").
Los agentes floculantes típicos son los polielectrolitos, tales como los policationes, que forman complejos con
impurezas con carga opuesta.

30 Los floculantes generalmente precipitan células, residuos celulares y proteínas debido a la interacción entre las
cargas de las células/proteínas y las cargas del polímero (por ejemplo, polielectrolitos), de esta manera se crean
complejos insolubles.

35 El uso de polímeros de polielectrolitos en la floculación para purificar proteínas está bien establecido en la técnica
(véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional del PCT núm. WO2008/091740). La precipitación mediante
floculantes puede realizarse con una amplia gama de polímeros, y la única característica general que se requiere es
que el polímero debe tener algún nivel de interacción con una especie de interés (por ejemplo, una molécula diana o
una impureza). Los floculantes ilustrativos incluyen polímeros tales como quitosano y polisacáridos.

40 La floculación también puede lograrse mediante un tratamiento químico que resulte en cambios en el pH o mediante
la adición de un tensioactivo.

45 Los expertos en la técnica conocen muchas formas de eliminar el material precipitado, tales como la centrifugación,
la filtración en profundidad, filtración o sedimentación o cualquier combinación de las mismas. La sedimentación
puede ir seguida por la decantación o filtración de la fase líquida o el sobrenadante.

50 En algunos aspectos preferidos, los polímeros sensibles al estímulo se usan para precipitar una o más impurezas.
Pueden encontrarse ejemplos de tales polímeros sensibles al estímulo, por ejemplo, en las publicaciones de Estados
Unidos núm. 20090036651, 20100267933 y 20110313066. Los polímeros sensibles al estímulo generalmente son
solubles en un disolvente de base acuosa bajo un determinado conjunto de condiciones del proceso tales como pH,
temperatura y/o concentración de sales y se vuelven insolubles al cambiar una o más de tales condiciones y
posteriormente precipitan. Los polímeros sensibles al estímulo ilustrativos incluyen, pero no se limitan a,
polialilamina, polialilamina modificada con un grupo bencilo o polivinilamina y polivinilamina modificada con un grupo
bencilo, donde el estímulo es el fosfato o el citrato.

55 En algunos aspectos, se añade continuamente un polímero sensible al estímulo mediante el uso de un mezclador
estático. En otros aspectos, tanto el polímero como el estímulo al que es sensible se añaden mediante el uso de un
mezclador estático.

60 En algunos aspectos, se usan moléculas pequeñas para precipitar una o más impurezas, especialmente impurezas
insolubles.

65 En algunos aspectos, las moléculas pequeñas usadas en los procesos descritos en la presente descripción son no
polares y catiónicas, por ejemplo, como se describe en la publicación del PCT núm. WO2013028334. Ejemplos de
moléculas pequeñas que pueden usarse para la clarificación incluyen, pero no se limitan a, sal de
monoalquiltrimetilamonio (los ejemplos no limitantes incluyen bromuro o cloruro de cetiltrimetilamonio, bromuro o
cloruro de tetradeciltrimetilamonio, cloruro de alquiltrimetilamonio, cloruro de alquiltrimetilamonio, bromuro o

cloruro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de dodecildimetil-2-fenoxietilamonio, cloruro o bromuro de hexadecilamina, dodecilamina o cloruro y bromuro o cloruro de cetildimetiletilamonio), una sal de monoalquildimetilbencilamonio (los ejemplos no limitantes incluyen cloruro de alquildimetilbencilamonio y cloruro de bencetonio), una sal de dialquildimetilamonio (los ejemplos no limitantes incluyen bromuro de domifeno, haluros de didecildimetilamonio (sales de bromuro y cloruro) y cloruro o bromuro de octildodecildimetilamonio), una sal de amonio heteroaromática (los ejemplos no limitantes incluyen haluros de cetilpiridinio (sales de cloruro o bromuro) y bromuro o cloruro de hexadecilpiridinio, isómero cis 1-[3-cloroalil]-3,5,7-triaza-1-azoniaadamantano, bromuro de alquillisoquinolinio y cloruro de alquildimetilnaftilmetilamonio), una sal de amonio cuaternario polisustituida (los ejemplos no limitantes incluyen sacarinato de alquildimetilbencilamonio y ciclohexilsulfamato de alquildimetiletilbencilamonio), y una sal de bis-amonio cuaternario (los ejemplos no limitantes incluyen 1,10-bis(cloruro de 2-metil-4-aminoquinolinio)-decano, 1,6-bis[cloruro de 1-metil-3-(2,2,6-trimetilciclohexil)-propildimetilamonio] hexano o cloruro de triclobisonio, y el bis-amonio cuaternario denominado CDQ por Buckman Brochures).

En una modalidad preferida particular, la molécula pequeña es cloruro de bencetonio (BZC).

En algunos aspectos, la clarificación se realiza directamente en un biorreactor. En otras palabras, un precipitante, por ejemplo, un polímero sensible al estímulo puede añadirse directamente a un biorreactor que contiene un cultivo de células que expresan una molécula diana, de esta manera precipitan las células y los residuos celulares, y donde la molécula diana permanece en la fase líquida obtenida como resultado de la precipitación. En algunos aspectos preferidos, la fase líquida se somete además a filtración en profundidad. La fase líquida también puede someterse a centrifugación, filtración, sedimentación o combinaciones de las mismas.

En otros aspectos, se añade un polímero sensible al estímulo a un recipiente que contiene el cultivo celular y está separado de un biorreactor. Por lo tanto, como se usa en la presente descripción, el término "recipiente" se refiere a un contenedor separado de un biorreactor que se usa para cultivar células.

En algunos aspectos, se añade un polímero sensible al estímulo a una muestra antes de la centrifugación, y la centrifugación va seguida de una filtración en profundidad. En tal proceso, el tamaño/volumen del filtro de profundidad que puede requerirse después de la centrifugación es más pequeño que el que se requiere en ausencia del polímero sensible al estímulo.

En algunos aspectos, una alimentación de cultivo celular clarificado se somete además a una composición de fluorocarbono cargada (CFC), para eliminar además las proteínas de la célula huésped (HCP), como se describe en la solicitud del PCT núm. PCT/US2013/32768 (ref. interna núm. MCA-1303PCT), presentada el 18 de marzo de 2013, que describe una membrana modificada con CFC para la eliminación de HCP. Las membranas modificadas con CFC también pueden usarse después de otras etapas del proceso de purificación, por ejemplo, después de la etapa de cromatografía de unión y elución de Proteína A o después de la etapa del proceso de purificación de flujo continuo o después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, que es parte de la etapa del proceso de purificación de flujo continuo.

La muestra clarificada se somete, típicamente, a una etapa de cromatografía de unión y elución.

Cromatografía de unión y elución

En diversos aspectos descritos en la presente descripción, los procesos y sistemas incluyen solo una única etapa del proceso de cromatografía de unión y elución para la captura, que típicamente, sigue a la clarificación. La cromatografía de unión y elución está destinada a unir la molécula diana, mientras que una o más impurezas fluyen a través (también denominada "etapa de captura"). La molécula diana unida se eluye posteriormente y el eluido o la salida de la etapa de cromatografía de unión y elución puede someterse a etapas de purificación adicionales.

La cromatografía de unión y elución puede emplear una única unidad de separación o dos o tres o más unidades de separación.

En diversos aspectos descritos en la presente descripción, la cromatografía de unión y elución que se usa es la cromatografía de unión y elución de afinidad o la cromatografía de unión y elución de intercambio catiónico o la cromatografía de unión y elución de modo mixto. Típicamente, la cromatografía de unión y elución emplea el uso de un medio destinado a unirse a la molécula diana.

En algunos aspectos preferidos, la cromatografía de unión y elución es una cromatografía de afinidad. Los medios de cromatografía adecuados que pueden usarse para la cromatografía de afinidad incluyen, pero no se limitan a, medios que tienen grupos funcionales de Proteína A, Proteína G o Proteína L (por ejemplo, ProSep® High Capacity (EMD Millipore), ProSep® Ultra Plus (EMD Millipore), Poros® MabCapture™ A (Life Technologies), Absolute® (NovaSep), Protein A Ceramic HyperD® (Pall Corporation), Toyopearl AF-rProtein A-650F (Tosoh), MabSelect® Sure (GE Healthcare)). Los medios adecuados suelen empaquetarse en una columna o dispositivo de cromatografía.

En una modalidad particular, el medio de cromatografía de afinidad incluye un ligando basado en la Proteína A acoplado a una matriz de polímero de poliviniléter hidrófilo rígido.

5 En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, el proceso de cromatografía de unión y elución emplea cromatografía continua de múltiples columnas, también denominada CMC.

10 En la cromatografía continua, típicamente se conectan varias columnas idénticas en una disposición que permite que las columnas operen en serie y/o en paralelo, en dependencia de los requisitos del método. Por tanto, todas las columnas pueden ejecutarse simultáneamente o pueden superponerse intermitentemente en su operación. Cada columna típicamente se carga, eluye y regenera varias veces durante una ejecución del proceso. En comparación con la cromatografía convencional, donde un único ciclo de cromatografía se basa en varias etapas consecutivas, tales como carga, lavado, elución y regeneración, en el caso de la cromatografía continua basada en múltiples columnas idénticas, todas estas etapas pueden ocurrir en diferentes columnas. En consecuencia, la operación de cromatografía continua puede resultar en una mejor utilización de la resina de cromatografía y una reducción de los requisitos del tampón, lo que beneficia la economía del proceso.

15 La cromatografía de unión y elución continua también incluye la cromatografía de lecho móvil simulado (SMB).

20 En algunos aspectos preferidos, la cromatografía de unión y elución emplea CMC que usa dos unidades de separación. En algunos otros aspectos preferidos, la cromatografía de unión y elución emplea la CMC que usa dos o tres o más unidades. En el caso de la CMC, la carga de una muestra suele ser continua; sin embargo, la elución es intermitente o discontinua (es decir, la CMC es de naturaleza semicontinua).

25 En algunos aspectos preferidos, la CMC emplea tres unidades de separación, cada una de las cuales contiene los mismos medios de cromatografía, y donde las unidades de separación se conectan de modo que el líquido puede fluir de una unidad de separación a la siguiente unidad de separación y de la última a la primera unidad de separación, donde la muestra se carga en la primera unidad de separación a un pH y conductividad que permite la unión de la molécula diana a la unidad de separación y donde al menos parte de la duración del tiempo de carga se superpone con la carga de la unidad de separación consecutiva, donde las dos unidades de separación están en comunicación fluida, de modo que permiten que cualquier molécula diana que no se una a la primera unidad de separación que se carga, se una a la siguiente unidad de separación.

35 Diferentes unidades de separación pueden estar en diferentes etapas del proceso en cualquier momento dado; es decir, mientras se carga una unidad de separación, la siguiente unidad de separación podría someterse a lavado, elución, reequilibrio, etc. Además, mientras la primera unidad de separación se somete a las etapas de lavado, elución, reequilibrio, la unidad de separación consecutiva se somete a la etapa de carga y así sucesivamente, de modo que la muestra fluya continuamente a través de las unidades de separación y tenga una velocidad por encima de 800 cm/h y que el medio de cromatografía de las unidades de separación comprenda partículas con un diámetro entre 40 y 200 μm y con diámetros de poro en el intervalo entre 50 nm y 200 nm.

40 En algunos aspectos, cada unidad de separación incluye un medio de cromatografía de afinidad tal como, por ejemplo, un medio basado en la Proteína A. En otros aspectos, cada unidad de separación incluye un medio de intercambio iónico (por ejemplo, un medio de cromatografía de intercambio catiónico) o un medio de cromatografía de modo mixto.

45 Los procesos de cromatografía continua ilustrativos que pueden usarse en la etapa del proceso de cromatografía de unión y elución, como se describe en la presente descripción, pueden encontrarse, por ejemplo, en las solicitudes de patente europeas núm. EP11008021.5 y EP12002828.7.

50 En algunos aspectos, las unidades de separación se conectan de manera circular, a lo que también se denomina lecho móvil simulado. Por ejemplo, en determinados casos, al menos tres unidades de separación se conectan en un círculo y la carga de la muestra se cambia secuencialmente de una unidad de separación a la siguiente, por ejemplo, como se describe en la patente europea núm. 2040811.

55 Se ha encontrado que la ejecución de la cromatografía de unión y elución en un modo semicontinuo o continuo permite usar un volumen reducido de un medio de afinidad, hasta en un 90 % del volumen usado en un proceso convencional. Además, pueden usarse unidades de separación con un diámetro reducido, entre un tercio y un quinto en comparación con un proceso discontinuo. Las unidades de separación pueden reutilizarse múltiples veces dentro del procesamiento de un lote particular de una molécula diana, por ejemplo, durante la producción discontinua de una molécula diana que es un candidato terapéutico.

60 En algunos aspectos, una unidad de separación que se carga con una muestra está en comunicación fluida con otra unidad de separación durante toda la duración del tiempo de carga.

65

En otros aspectos, la unidad de separación que se carga está en comunicación fluida con otra unidad de separación solo durante una parte de la duración del tiempo de carga. En algunos aspectos, dos unidades de separación están en comunicación fluida solo durante la segunda mitad de la duración del tiempo de carga.

5 En un modo de cromatografía discontinuo, típicamente la carga de una unidad de separación (por ejemplo, una columna de cromatografía) se detiene antes de que un exceso de molécula diana sature la unidad de separación. Por el contrario, en el caso de una etapa del proceso de cromatografía de unión y elución de CMC, como se usa en los procesos y sistemas descritos en la presente descripción, la carga de una unidad de separación no tiene que detenerse ya que las moléculas diana que no se unen a una unidad de separación se mueven a la siguiente unidad de separación debido a la comunicación fluida entre las dos unidades de separación, donde la salida de una unidad de separación se conecta con la entrada de una segunda unidad de separación y así sucesivamente. Se entiende que un experto en la técnica puede determinar fácilmente cuando, durante la etapa de carga, la cantidad de una molécula diana que no se une a la unidad de separación que se carga es suficientemente alta, de modo que la salida de la unidad de separación que se carga debe conectarse a la entrada de otra unidad de separación. Se ha encontrado que este aspecto es especialmente efectivo si las unidades de separación comprenden medios que tienen un diámetro de partícula entre 40 y 200 μm y un diámetro de poro que varía entre 50 y 200 nm. Con tales medios, la alimentación de carga puede funcionar continuamente a una velocidad por encima de 800 cm/h. Pueden encontrarse detalles adicionales en el documento EP12002828.7, presentado el 23 de abril de 2012. En algunos aspectos, la salida de la unidad de separación o las unidades de separación que se lavan está en comunicación fluida con la unidad de separación previa para que las moléculas diana eliminadas por dicho lavado no se pierdan, sino que se carguen en la unidad de separación previa.

Se ha encontrado que el nivel de impurezas (por ejemplo, HCP) que terminan en la mezcla de muestras de elución que contiene la molécula diana puede reducirse significativamente con el uso de determinados aditivos en la carga de la muestra durante la cromatografía de unión y elución. De hecho, la adición de determinados aditivos a la muestra antes de la carga o durante la carga de la muestra puede evitar la necesidad de usar etapas de lavado específicas típicamente diseñadas para mejorar la eliminación de impurezas. En otras palabras, el número de etapas de lavado que se usan típicamente se reduce mediante la inclusión de determinados aditivos antes de la carga o durante la carga de la muestra.

En el contexto de la cromatografía continua, se requiere una columna de Proteína A que haya completado la etapa de carga y se mueva a zonas posteriores para completar todas las etapas necesarias dentro de un marco de tiempo esperado, de modo que la columna estará lista para aceptar la solución de carga nueva, por ejemplo, como se describe en la presente descripción, se puede encontrar, por ejemplo, en las solicitudes de patente europeas núm. EP11008021.5 y EP12002828.7. El tiempo que se requiere para completar todas las etapas necesarias depende del número de etapas o zonas por las que debe pasar la columna para que esté lista para cargarla nuevamente. Al reducir o eliminar etapas, tales como el lavado intermedio, se permite la aplicación de la cromatografía continua para títulos más altos (concentraciones de proteína diana) donde se espera que la fase de carga sea más corta, así como también se simplifica el tiempo requerido para todas las condiciones de título durante la cromatografía continua.

Los aditivos ilustrativos que pueden emplearse para reducir o eliminar una o más etapas de lavado intermedio incluyen, pero no se limitan a, sales, polímeros, tensioactivos o detergentes, disolventes, agentes caotrópicos y cualquier combinación de los mismos. Una "sal" es un compuesto formado por la interacción de un ácido y una base. Los ejemplos de sales incluyen cualquiera y todas las sales de cloruro, sales de sulfato, sales de fosfato, sales de acetato y/o de citrato, por ejemplo, cloruro de sodio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, cloruro de potasio, acetato de sodio. En una modalidad particular, la sal es NaCl (por ejemplo, añadida a una concentración final de NaCl 0,5 M). El término "sal hidrófoba" se refiere a un tipo específico de sal con un componente hidrófobo tal como alquilaminas; cloruro de tetrametilamonio (TMAC), cloruro de tetraetilamonio (TEAC), cloruro de tetrapropilamonio y cloruro de tetrabutilamonio. Un "polímero", como se usa en la presente descripción, es una molécula formada mediante enlaces covalentes de dos o más monómeros, donde los monómeros no son residuos de aminoácidos. Los ejemplos de polímeros incluyen polietilenglicol (PEG), propilenglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, PF68, etc.). En una modalidad particular, el polímero es PEG.

El término "detergente" se refiere a tensioactivos, tanto iónicos como no iónicos, tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Tritón; dodecilsulfato de sodio (SDS); lauril sulfato de sodio; octil glucósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaina; (véase el documento US6870034B2 para más detergentes). En una modalidad particular, el detergente es un polisorbato, tal como el polisorbato 20 (Tween 20).

El término "disolvente" se refiere a una sustancia líquida capaz de disolver o dispersar una o más sustancias para proporcionar una solución. En algunos aspectos, el disolvente es un disolvente orgánico no polar, tal como el etanol, metanol, isopropanol, acetonitrilo, hexilenglicol, propilenglicol y 2,2-tiodiglicol. El término "sal caotrópica" se refiere a sales que se conoce que perturba la estructura intermolecular del agua. Un ejemplo de tal sal es la urea y el hidrocloreuro de guanidina.

65

En algunos aspectos, uno o más aditivos se mezclan continuamente con un cultivo celular clarificado mediante el uso de uno o más mezcladores estáticos. En consecuencia, en algunos aspectos, una muestra de cultivo celular clarificado fluye continuamente a la etapa de cromatografía de Proteína A en un proceso de purificación de proteínas, donde uno o más aditivos, como se describe en la presente descripción, se mezclan continuamente con el cultivo celular clarificado antes de cargarlo en una matriz de cromatografía de Proteína A.

Inactivación de virus

En algunos aspectos, de acuerdo con los procesos y sistemas descritos en la presente descripción, la cromatografía de unión y elución va seguida de la inactivación de virus (VI). Se entiende que la inactivación de virus puede no realizarse necesariamente, si no que se considera opcional.

Preferentemente, la salida o eluido de la cromatografía de unión y elución se somete a la inactivación de virus. La inactivación viral hace que los virus se inactiven o sean incapaces de infectar, lo que es importante, especialmente en el caso de que la molécula diana esté destinada a un uso terapéutico.

Muchos virus contienen capas de lípidos o proteínas que pueden inactivarse mediante alteraciones químicas. En lugar de simplemente inactivar el virus, algunos procesos de inactivación viral son capaces de desnaturalizar el virus por completo. Los métodos para inactivar virus son bien conocidos por un experto en la técnica. Algunos de los procesos de inactivación de virus más ampliamente usados incluyen, por ejemplo, el uso de uno o más de los siguientes: inactivación con disolvente/detergente (por ejemplo, con Tritón X 100); pasteurización (calentamiento); inactivación por pH ácido; e inactivación por luz ultravioleta (UV). Es posible combinar dos o más de estos procesos; por ejemplo, realizar una inactivación con pH ácido a temperatura elevada.

Para garantizar una inactivación de virus completa y efectiva, la inactivación de virus se realiza a menudo durante un período de tiempo prolongado, con agitación constante para garantizar la mezcla apropiada de un agente de inactivación de virus con la muestra. Por ejemplo, en muchos procesos a gran escala que se usan hoy en día en la industria, una salida o eluido de una etapa de captura se recolecta en un tanque de depósito y se somete a la inactivación de virus durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, >1 a 2 horas, a menudo seguido de almacenamiento durante toda la noche).

En diversos aspectos descritos en la presente descripción, el tiempo requerido para la inactivación de virus se reduce significativamente al realizar la inactivación de virus en línea o mediante el empleo de un tanque de compensación en lugar de un tanque de depósito para esta etapa.

Pueden encontrarse ejemplos de técnicas de inactivación de virus que pueden usarse en los procesos descritos en la presente descripción, por ejemplo, en la solicitud de patente del PCT núm. PCT/US2013/45677 (ref. interna núm. P12/098PCT).

En algunos aspectos preferidos, la inactivación de virus emplea el uso de pH ácido, donde la salida de la etapa de cromatografía de unión y elución se somete a la exposición en línea a pH ácido para la inactivación de virus. El pH usado para la inactivación de virus es típicamente menor que 5,0 o preferentemente entre 3,0 y 4,0. En algunos aspectos, el pH es de alrededor de 3,6 o inferior. El tiempo usado para la inactivación de virus mediante el uso de un método en línea puede variar entre 10 minutos o menos, 5 minutos o menos, 3 minutos o menos, 2 minutos o menos, hasta alrededor de 1 minuto o menos. En el caso de un tanque de compensación, el tiempo requerido para la inactivación es, típicamente, menor que 1 hora, o preferentemente menor que 30 minutos.

En algunos aspectos descritos en la presente descripción, un agente de inactivación de virus adecuado se introduce en línea en un tubo o línea de conexión entre la cromatografía de unión y elución y la siguiente operación unitaria en el proceso (por ejemplo, purificación de flujo continuo), donde preferentemente, el tubo o la línea de conexión contiene un mezclador estático que garantiza la mezcla apropiada de la salida de la etapa del proceso de cromatografía de unión y elución con el agente de inactivación de virus, antes de que la salida pase a la siguiente operación unitaria. Típicamente, la salida de la cromatografía de unión y elución fluye a través del mezclador estático a una determinada velocidad de flujo, lo que garantiza un tiempo de contacto mínimo con el agente de inactivación de virus. El tiempo de contacto puede ajustarse mediante el uso de mezcladores estáticos de una determinada longitud y/o diámetro.

En algunos aspectos, se introduce adicionalmente una base o un tampón adecuado en el tubo o línea de conexión después de la exposición a un ácido durante un tiempo, para de esta manera llevar el pH de la muestra a un pH adecuado para la siguiente etapa, donde el pH no es perjudicial para la molécula diana. En consecuencia, en algunos aspectos preferidos, tanto la exposición a un pH bajo, así como también a un tampón básico se logra en línea a través de la mezcla con un mezclador estático.

En algunos aspectos, en lugar de un mezclador estático en línea, o además de un mezclador estático en línea, se usa un tanque de compensación para tratar la salida de la cromatografía de unión y elución con un agente de inactivación de virus, donde el volumen del tanque de compensación no es más del 25 % del volumen total de la

salida de la cromatografía de unión y elución o no más del 15 % o no más del 10 % del volumen de la salida de la cromatografía de unión y elución. Debido a que el volumen del tanque de compensación es significativamente menor que el volumen de un tanque de depósito típico puede lograrse una mezcla más eficiente de la muestra con el agente de inactivación de virus.

5

En algunos aspectos, la inactivación de virus puede lograrse mediante un cambio del pH del tampón de elución durante la cromatografía de unión y elución, en lugar de tener que cambiar el pH de la salida de la cromatografía de unión y elución.

10 En algunos aspectos descritos en la presente descripción, la muestra se somete a un proceso de purificación de flujo continuo, después de la inactivación de virus. En algunos aspectos, puede incluirse una etapa de filtración después de la inactivación de virus y antes de la purificación de flujo continuo. Tal etapa puede ser conveniente, especialmente en los casos donde se observa turbidez de la muestra después de la inactivación de virus. Tal etapa de filtración puede emplear un filtro microporoso o un filtro de profundidad.

15 Aunque, en los procesos donde la etapa de inactivación de virus es opcional, la salida de la cromatografía de unión y elución puede someterse directamente a una purificación de flujo continuo.

20 Purificación de flujo continuo

En diversos aspectos descritos en la presente descripción, la salida de la cromatografía de unión y elución se somete a una operación de purificación de flujo continuo, ya sea directamente o después de la inactivación de virus. En algunos aspectos, la operación de purificación de flujo continuo usada en los procesos y sistemas descritos en la presente descripción emplea dos o más etapas o dispositivos o métodos del proceso para lograr la purificación de flujo continuo, que está destinada a eliminar una o más impurezas presentes en la salida de la cromatografía de unión y elución, con o sin inactivación de virus.

25

En algunos aspectos preferidos, la operación de purificación de flujo continuo, como se describe en la presente descripción, incluye una o más de las siguientes etapas realizadas en un modo de flujo continuo: carbón activado; cromatografía de intercambio aniónico; cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de modo mixto, cromatografía de interacciones hidrófobas y filtración de virus, o las combinaciones de las mismas. En algunos aspectos, pueden usarse una o más válvulas, mezcladores estáticos en línea y/o tanques de compensación entre dos o más de estas etapas, para cambiar las condiciones de la solución.

30

35 Las diversas etapas, una o más de los cuales pueden usarse para lograr la purificación de flujo continuo, se describen con más detalle a continuación.

Como se describe en la presente descripción, en algunos aspectos, en algunos aspectos preferidos, la purificación de flujo continuo emplea al menos una etapa de cromatografía de intercambio aniónico de flujo continuo (AEX), donde una o más impurezas que aún permanecen en la muestra que contiene la molécula diana se unen al medio de la cromatografía de intercambio aniónico, mientras que la molécula diana fluye a través de él.

40

En algunos aspectos, la cromatografía de modo mixto de flujo continuo o la cromatografía de interacciones hidrófobas de flujo continuo pueden usarse en lugar, o además de, la cromatografía de intercambio aniónico de flujo continuo.

45

Los medios de intercambio aniónico ilustrativos que pueden emplearse para la cromatografía AEX incluyen, pero no se limitan a, los basados en iones de amonio cuaternario, así como también intercambiadores de aniones débiles, tal como los basados en una amina primaria, secundaria y terciaria. Ejemplos adicionales de medios de intercambio aniónico adecuados son Q Sepharose® disponible de GE Healthcare Bio-Sciences AB, Fractogel TMAE y Eshmuno Q disponible de EMD Chemicals, Mustang® Q disponible de Pall Corp., Sartobind® Q disponible de Sartorius Stedim y dispositivos ChromaSorb™ disponibles de EMD Millipore.

50

Los medios pueden estar en forma de partículas, membranas, materiales porosos o materiales monolíticos. En aspectos preferidos, los medios son matrices basadas en membranas, también llamadas adsorbentes de membrana. El adsorbente de membrana es preferentemente una lámina de membrana porosa hecha mediante métodos de separación de fases bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Zeman L J, Zydney A L, Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications, New York: Marcel Dekker, 1996. Las membranas tubulares y de fibra hueca también son matrices aceptables. Los adsorbentes de membrana típicamente tienen una altura de lecho de 0,5 a 5 mm.

55

60

Las membranas pueden fabricarse a partir de una amplia gama de materiales poliméricos conocidos en la técnica, que incluyen poliolefinas, tales como el polietileno y el polipropileno, fluoruro de polivinilideno, poliamida, politetrafluoroetileno, celulósicos, polisulfona, poliacrilonitrilo, etc.

65

Para impartirles propiedades de intercambio aniónico, la superficie de las membranas por lo general se modifica mediante recubrimiento, injerto, adsorción y modificación por plasma con monómeros y/o polímeros adecuados.

5 En algunos aspectos, el medio de intercambio aniónico que se usa para el intercambio aniónico de flujo continuo es un medio basado en una membrana que tiene una superficie recubierta con un polímero reticulado que tiene grupos de amina primaria unidos, tales como una polialilamina o una polialilamina protonada.

10 Pueden encontrarse medios adecuados adicionales en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 8.137.561, que describe medios cromatográficos o de adsorción porosos que tienen un recubrimiento polimérico poroso formado sobre un sustrato autoportante poroso e intercambiadores aniónicos que incluyen tales medios, así como también métodos de uso para purificar una molécula diana mediante el uso de tales medios. Tales medios son adecuados particularmente para la robusta eliminación de impurezas minoritarias de las moléculas diana fabricadas, tales como anticuerpos monoclonales, de una manera que se integran bien en los procesos de purificación posteriores existentes. Las impurezas típicas incluyen ADN, endotoxinas, HCP y virus. Tales medios funcionan bien a una alta concentración de sales y una alta conductividad (alta afinidad) y eliminan, de manera efectiva, los virus incluso en tales condiciones. Se logra una alta capacidad de unión sin sacrificar la permeabilidad del dispositivo. De hecho, en dependencia de las propiedades del recubrimiento, pueden lograrse capacidades de unión de ácidos nucleicos superiores a alrededor de 5 mg/ml, o superiores a alrededor de 25 mg/ml, o superiores a alrededor de 35-40 mg/ml. La cantidad del adsorbente de intercambio aniónico es mucho menor que la usada para un proceso comparable basado en perlas.

25 En algunos aspectos, las membranas que tienen una función de intercambio aniónico se encapsulan en un dispositivo de múltiples capas adecuado que proporciona un flujo uniforme a través de toda la pila de membranas. Los dispositivos pueden ser desechables o reutilizables, y pueden ser ensamblados previamente por el fabricante de la membrana o ensamblados por el usuario final. Los materiales de la carcasa del dispositivo incluyen resinas termoplásticas, como polipropileno, polietileno, polisulfona, fluoruro de polivinilideno y similares; resinas termoestables tales como resinas acrílicas, siliconas y epoxi; y metales tales como el acero inoxidable. La membrana puede unirse permanentemente a la carcasa del dispositivo, mediante el uso de un adhesivo o unión térmica, o puede mantenerse en su lugar mediante compresión y juntas cuidadosamente colocadas.

30 En algunos aspectos preferidos, el dispositivo de adsorción de intercambio aniónico se usa en el valor de pH de la solución que está al menos 0,5-1,0 unidades por debajo del punto isoeléctrico de la proteína diana. El intervalo de pH preferido del dispositivo de adsorción de intercambio aniónico es de alrededor de 6 a alrededor de 8. El intervalo adecuado de concentración de sales está entre 0 y 500 mM, más preferentemente entre 10 y 200 mM.

35 En algunos aspectos, la purificación de flujo continuo puede emplear etapas adicionales. Por ejemplo, en una modalidad, se usan uno o más etapas adicionales de flujo continuo además de la cromatografía de intercambio aniónico (AEX). Las etapas de flujo continuo adicionales incluyen, por ejemplo, cromatografía de modo mixto, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacciones hidrófobas, carbón activado, exclusión por tamaño o combinaciones de las mismas.

40 Las etapas adicionales que pueden incluirse en la purificación de flujo continuo incluyen, por ejemplo, el uso de carbón activado antes de la cromatografía de intercambio aniónico o después de la cromatografía de intercambio aniónico (y/o una o más de modo mixto e HIC). En algunos aspectos, el carbón activado se incorpora a un medio de celulosa, por ejemplo, en una columna o un dispositivo. Alternativamente, el carbón activado puede combinarse con un medio de intercambio aniónico (por ejemplo, en una columna o un cartucho), de esta manera se eliminan, además, una o más impurezas de una muestra que contiene una molécula diana. La columna o cartucho también puede ser desechable, por ejemplo, Millistak[®] Pod. Los medios pueden estar en forma de partículas, membranas, materiales porosos fibrosos o materiales monolíticos. En el caso del carbón activado, puede impregnarse en un material poroso, por ejemplo, un material poroso fibroso.

45 Se ha encontrado que una etapa de carbón activado de flujo continuo antes de la cromatografía de intercambio aniónico de flujo continuo es adecuada especialmente para la eliminación de proteínas de la célula huésped y la Proteína A lixiviada. También es capaz de eliminar una cantidad significativa de posibles impurezas del medio de cultivo celular, tales como hormonas, tensioactivos, antibióticos y compuestos antiespumantes. Además, se ha encontrado que un dispositivo que contiene carbón activado reduce el nivel de turbidez en la muestra, por ejemplo, generado durante el aumento del pH de las fracciones de elución de Proteína A.

50 Pueden encontrarse detalles adicionales sobre materiales carbonosos, carbón activado y su uso en procesos de purificación de flujo continuo, en la publicación del PCT núm. WO2013/028330.

Como se discutió anteriormente, la operación de purificación de flujo continuo usada en los procesos y sistemas descritos en la presente descripción puede incluir más de una etapa de flujo continuo.

65 En aspectos preferidos, la purificación de flujo continuo incluye además uno o más etapas de flujo continuo adicionales, por ejemplo, para la eliminación de agregados y la filtración de virus. En algunos aspectos, la muestra

se pasa a través de un filtro de profundidad de adsorción, o una capa o capas microporosas cargadas o modificadas en un modo de operación de filtración de flujo normal, para la eliminación de agregados. Pueden encontrarse ejemplos de etapas de flujo continuo que pueden usarse para la eliminación de agregados en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núm. 7,118,675 y 7,465,397. En consecuencia, en algunos aspectos, puede usarse un proceso de filtración de dos etapas para eliminar los agregados de proteínas y las partículas virales, en donde se filtra primero una muestra a través de una o más capas de filtros de profundidad de adsorción, membranas porosas cargadas o modificadas en la superficie, o un lecho pequeño de medios de cromatografía para producir una muestra libre de agregados de proteínas. Esto puede ir seguido por el uso de una membrana de ultrafiltración para la filtración de virus, como se describe con más detalle más abajo. Las membranas de ultrafiltración usadas para la filtración de virus se denominan, típicamente, membranas de nanofiltración.

En algunos aspectos, una etapa de flujo continuo adicional emplea un medio de cromatografía de intercambio catiónico (CEX). En la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 13/783,941 (ref. interna núm. MCA-1423) pueden encontrarse detalles adicionales de los dispositivos de intercambio catiónico de flujo continuo y su uso. En consecuencia, en algunos aspectos, un medio de cromatografía de intercambio catiónico que se usa después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico emplea un soporte sólido que contiene uno o más grupos de unión de intercambio catiónico a una densidad de 1 a 30 mM. Tales soportes sólidos son capaces de unir agregados de proteínas en relación con los monómeros con una selectividad superior a alrededor de 10.

En algunos aspectos, puede usarse un medio de filtración cargado negativamente para eliminar los agregados de proteínas, por ejemplo, que comprende un sustrato poroso recubierto con un recubrimiento de acrilamidoalquilo reticulado polimerizado, cargado negativamente, polimerizado in situ en la superficie del sustrato tras la exposición a un haz de electrones y en ausencia de un iniciador químico de la polimerización por radicales libres, donde el recubrimiento se forma a partir de un monómero de acrilamidoalquilo polimerizable que tiene uno o más grupos laterales cargados negativamente y un agente de reticulación de acrilamida. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre tales medios de filtración, por ejemplo, en la publicación del PCT núm. WO2010/098867.

El uso de una etapa de intercambio catiónico de flujo continuo (CEX) puede requerir una reducción del pH de la solución para aumentar la afinidad y la capacidad para las impurezas, tales como los agregados de anticuerpos. Tal reducción del pH puede realizarse mediante una simple adición en línea de una solución adecuada que contenga ácido, a través de una válvula de tres vías, un conector en T, un mezclador estático u otros dispositivos adecuados bien conocidos en la técnica. Además, puede emplearse un pequeño recipiente de compensación para proporcionar una mezcla adicional y acceso para el muestreo. El volumen del recipiente de compensación, que puede tener la forma de una bolsa, un contenedor o un tanque, suele ser considerablemente más pequeño que el volumen del fluido procesado con una configuración de flujo continuo, por ejemplo, no más del 10 % del volumen del fluido.

En algunos aspectos, los medios de intercambio catiónico eliminan los agregados de proteínas y/o actúan como un filtro previo para una membrana de filtración de virus, que típicamente se usa después de la cromatografía de intercambio catiónico.

En otra modalidad, los agregados de proteínas pueden eliminarse mediante el uso de un material de filtro compuesto que comprende una sal de fosfato de calcio. Las sales de fosfato de calcio adecuadas son fosfato dicálcico anhidro, fosfato dicálcico deshidratado, fosfato tricálcico y fosfato tetracálcico. En otra modalidad, la sal de fosfato de calcio es hidroxiapatita. Las condiciones de la solución típicamente se ajustan antes de cargar la muestra en tal dispositivo, en particular, las concentraciones de iones de fosfato y la fuerza iónica. En el documento WO2011156073 A1 pueden encontrarse detalles adicionales sobre la eliminación de los agregados de proteínas mediante el uso de un material de filtro compuesto que comprende una sal de fosfato de calcio en un modo de flujo continuo.

Toda la operación de purificación de flujo continuo (que incluye la etapa de cromatografía de intercambio aniónico y una o más etapas adicionales, como se describe en la presente descripción), se realiza de forma continua sin el uso de un tanque de depósito entre las etapas del proceso de flujo continuo.

En algunos aspectos, el proceso de purificación de flujo continuo incluye además la filtración de virus. Sin embargo, la filtración de virus es opcional y puede que no se use necesariamente siempre.

En algunos aspectos, la filtración de virus implica una filtración basada en la exclusión por tamaño, también conocida como tamizado.

Para la eliminación de virus, la muestra típicamente se pasa a través de un filtro de ultrafiltración que retiene los virus mientras la molécula diana pasa a través de él. De acuerdo con la IUPAC, la ultrafiltración es un "proceso de separación basado en membranas e impulsado por presión en el que se descartan partículas y macromoléculas disueltas más pequeñas que 0,1 μm y más grandes que alrededor de 2 nm". (IUPAC, "Terminology for membranes and membrane processes" publicado en Pure Appl. Chem., 1996, 68, 1479). Las membranas de ultrafiltración usadas en esta etapa suelen diseñarse específicamente para eliminar virus. Por el contrario de las membranas de ultrafiltración usadas para la concentración de proteínas y el intercambio de tampones, estas membranas por lo general no se caracterizan por los límites de peso molecular, sino por la retención típica de las partículas virales. La

retención viral se expresa en el valor de reducción logarítmica (LRV), que es simplemente un Log_{10} de la relación de partículas virales en el alimento y el filtrado en una prueba estandarizada. El uso de la filtración viral en los procesos de purificación se puede encontrar en, por ejemplo, Meltzer, T. y Jornitz, M., eds., "Filtration and Purification in the Biopharmaceutical Industry", 2.^a ed., Informa Healthcare, 2008, capítulo 20.

5

Las membranas de retención de virus pueden fabricarse en forma de lámina plana, como Viresolve[®] Pro de EMD Millipore Corporation, Ultipor[®] VF Grade DV20 de Pall Corporation, Virosart[®] CPV de Sartorius Stedim Biotech, o en forma de fibra hueca, tales como Planova[™] 20N de Asahi Kasei Medical Co. Pueden ser productos de una sola capa o de múltiples capas, y pueden fabricarse mediante uno de los muchos procesos de producción de membranas conocidos en la técnica. Puede lograrse una combinación particularmente beneficiosa de la capacidad de retención para una membrana asimétrica de retención de virus compuesta, como se describe en la publicación de Estados Unidos núm. 20120076934 A1.

10

En una modalidad particular, la operación de purificación de flujo continuo implica al menos una etapa de carbón activado, una etapa de cromatografía de intercambio aniónico, una etapa de cromatografía de intercambio catiónico y una etapa de filtración de virus.

15

Después de la filtración de virus, la muestra que contiene la molécula diana puede someterse a uno o más etapas de formulación/concentración adicionales.

20

Etapas del proceso adicionales

Como se discutió anteriormente, en algunos aspectos, la muestra se somete a uno o más etapas del proceso adicionales después de la filtración de virus.

25

En algunos aspectos, una o más etapas adicionales incluyen la formulación, que puede emplear diafiltración/concentración seguida de filtración estéril.

30

En algunos aspectos, después de la filtración de virus, la muestra que contiene la molécula diana se somete a diafiltración, que típicamente emplea el uso de una membrana de ultrafiltración en un modo de filtración de flujo tangencial (TFF). En el caso de la filtración de flujo tangencial (TFF), el fluido se bombea tangencialmente a lo largo de la superficie del medio del filtro. Una presión aplicada sirve para forzar una porción del fluido a través del medio del filtro hacia el lado del filtrado.

35

La diafiltración resulta en el reemplazo del fluido que contiene la molécula diana por el tampón deseado para la formulación de la molécula diana. La diafiltración va seguida, típicamente, de una etapa para concentrar la molécula diana, que se realiza mediante el uso de la misma membrana.

40

En otra modalidad, la filtración de flujo tangencial de un solo paso (SPTFF) puede usarse para la concentración/diafiltración. Un módulo de SPTFF incluye múltiples dispositivos de ultrafiltración conectados en serie. La proteína diana está lo suficientemente concentrada/diafiltrada después de un solo paso a través del módulo de SPTFF sin necesidad de un bucle de retenido ni de una bomba, lo que permite una operación continua. Puede encontrarse más información en la presentación titulada "Single pass TFF" de Herb Lutz y otros, presentada en la conferencia de la American Chemical Society en la primavera de 2011.

45

Después de la diafiltración/concentración, la muestra se somete a una etapa de filtración estéril para el almacenamiento o cualquier otro uso.

50

La filtración estéril típicamente se lleva a cabo mediante el uso de la filtración de flujo normal (NFF), donde la dirección de la corriente de fluido es perpendicular al medio del filtro (por ejemplo, una membrana) bajo una presión aplicada.

Sistemas

55

La descripción también proporciona sistemas para purificar una molécula diana, en donde los sistemas incluyen dos o más operaciones unitarias conectadas para que estén en comunicación fluida entre sí, de modo que se realice un proceso para purificar una molécula diana de manera continua o semicontinua. Cada operación unitaria puede emplear uno o más dispositivos para lograr el propósito deseado de esa operación unitaria. En consecuencia, en algunos aspectos, los sistemas descritos en la presente descripción incluyen varios dispositivos que se conectan para permitir que el proceso de purificación se ejecute de manera continua o semicontinua.

60

Sin pretender limitarse a la teoría, se contempla que un sistema puede encerrarse en un entorno estéril cerrado, para que de esta manera se realice todo el proceso de purificación de una manera estéril.

65

En diversos aspectos, el primer dispositivo en un sistema es un biorreactor que contiene el material de partida, por ejemplo, cultivar las células que expresan una proteína a purificar. El biorreactor puede ser cualquier tipo de

5 biorreactor como un biorreactor discontinuo o un biorreactor semicontinuo o un biorreactor continuo, como un biorreactor de fermentación de perfusión continua. El biorreactor puede estar hecho de cualquier material adecuado y puede ser de cualquier tamaño. Los materiales típicos son acero inoxidable o plástico. En una modalidad, el biorreactor es un biorreactor desechable, por ejemplo, en forma de una bolsa flexible y plegable, diseñada para un solo uso.

10 La clarificación puede realizarse directamente en el biorreactor, o alternativamente, el biorreactor puede simplemente usarse para cultivar las células, y la clarificación se realiza en un recipiente diferente. En otra modalidad más, el cultivo celular simplemente fluye a través de un dispositivo de filtración en profundidad para eliminar una o más impurezas. En consecuencia, en algunos aspectos preferidos, el biorreactor está en comunicación fluida con un dispositivo para realizar la filtración en profundidad.

15 El dispositivo para realizar la clarificación (por ejemplo, un dispositivo de filtración en profundidad) generalmente se conecta para estar en comunicación fluida con un dispositivo para realizar la captura mediante el uso de una cromatografía de unión y elución (por ejemplo, un dispositivo de cromatografía continua de múltiples columnas que comprende dos o más unidades de separación). En algunos aspectos, el dispositivo para la cromatografía de unión y elución se conecta para estar en comunicación fluida con una operación unitaria, para realizar la purificación de flujo continuo, que puede incluir más de un dispositivo/etapa. En algunos aspectos, se incluye un mezclador estático en línea o un tanque de compensación entre el dispositivo para la cromatografía de unión y elución y el primer dispositivo usado para la purificación de flujo continuo.

20 En algunos aspectos, la operación de purificación de flujo continuo incluye más de un dispositivo, por ejemplo, un dispositivo de carbón activado seguido de un dispositivo de cromatografía AEX seguido de un mezclador estático en línea y/o un tanque de compensación para cambiar el pH, seguido de un dispositivo de cromatografía CEX seguido de un dispositivo de filtración de virus. Los dispositivos generalmente pueden estar en cualquier formato adecuado, por ejemplo, una columna o un cartucho.

25 Las últimas operaciones unitarias en el sistema pueden incluir uno o más dispositivos para lograr la formulación, que incluye la diafiltración/concentración y filtración estéril.

30 Típicamente, cada dispositivo incluye al menos una entrada y al menos una salida, para permitir que la salida de un dispositivo esté en comunicación fluida con la entrada de un dispositivo consecutivo en el sistema.

35 En la mayoría de los procesos y sistemas usados en la industria hoy en día, cada dispositivo usado en un proceso de purificación emplea una unidad de equipo del proceso, también denominada "patín", que típicamente incluye las bombas, válvulas, sensores y soportes para dispositivos necesarios. Típicamente, al menos un patín está asociado con cada dispositivo. En algunos de los aspectos descritos en la presente descripción, se reduce el número de patines usados a lo largo del proceso de purificación. Por ejemplo, en algunos aspectos, solo se usa un patín para realizar toda la operación de purificación de flujo continuo, que puede incluir múltiples dispositivos, por ejemplo, dispositivo de carbón activado, dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico, dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico y dispositivo de filtración de virus, junto con cualquier equipo necesario para los cambios en las condiciones de la solución. En consecuencia, en algunos aspectos, puede usarse un único patín para todas las etapas anteriores en la purificación de flujo continuo.

40 En algunos aspectos, la comunicación fluida entre los diversos dispositivos es continua; en que el fluido fluye directamente a través de todos los dispositivos sin interrupciones. En otros aspectos, pueden incluirse una o más válvulas, sensores, detectores, tanques de compensación y equipos para cualquiera de los cambios de la solución en línea entre los diversos dispositivos, para de esta manera interrumpir temporalmente el flujo de fluido a través del sistema, si es necesario, por ejemplo, para reemplazar/eliminar un dispositivo particular.

45 En algunos aspectos, se incluyen uno o más tanques de compensación entre los diversos dispositivos. En algunos aspectos, no más de 3 y no más de 2 tanques de compensación están presentes en todo el sistema. Los tanques de compensación ubicados entre diferentes dispositivos no tienen más del 25 %, y preferentemente no más del 10 % del volumen total de la salida del primero de los dos dispositivos.

50 En algunos aspectos preferidos, los sistemas descritos en la presente descripción incluyen uno o más mezcladores estáticos para el intercambio de tampón y/o la dilución en línea.

55 En algunos aspectos, un sistema incluye, además, uno o más sensores y/o sondas para controlar y/o supervisar uno o más parámetros del proceso dentro del sistema, por ejemplo, temperatura, presión, pH, conductividad, oxígeno disuelto (DO), dióxido de carbono disuelto (DCO₂), velocidad de mezcla, velocidad de flujo, parámetros del producto. El sensor también puede ser un sensor óptico en algunos casos.

60 En algunos aspectos, el control del proceso puede lograrse de manera que no comprometa la esterilidad del sistema.

En algunos aspectos, los sensores y/o sondas pueden conectarse a un módulo electrónico de sensores, cuya salida puede enviarse a un tablero de terminales y/o una caja de relés. Los resultados de las operaciones de detección pueden ingresarse en un sistema de control implementado por computadora (por ejemplo, una computadora) para el cálculo y control de diversos parámetros (por ejemplo, mediciones de temperatura y peso/volumen, pureza) y para la visualización y la interfaz de usuario. Tal sistema de control además puede incluir también una combinación de sistemas electrónicos, mecánicos y/o neumáticos para controlar los parámetros del proceso. Debe apreciarse que el sistema de control puede realizar otras funciones y la descripción no se limita a tener cualquier función particular o conjunto de funciones.

Esta descripción se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Proceso para purificar un anticuerpo monoclonal

En este ejemplo representativo, la purificación de un anticuerpo monoclonal se logra mediante el uso de un proceso de purificación de manera continua, donde diversas operaciones unitarias se conectan de manera que operen de manera continua. Un proceso ilustrativo se representa en la Figura 2.

El ejemplo representativo que se describe más abajo incluye las siguientes etapas realizadas en la secuencia que se enumera: clarificación mediante el uso de la filtración en profundidad; uso de uno o más mezcladores estáticos en línea para cambiar las condiciones de la solución; la cromatografía de unión y elución de Proteína A mediante el uso de la cromatografía continua de múltiples columnas que emplea dos unidades de separación; el ajuste del pH de la salida mediante el uso de uno o más mezcladores estáticos; y la purificación de flujo continuo que emplea la filtración en profundidad seguida de carbón activado seguido de la cromatografía de intercambio aniónico seguida de un ajuste del pH mediante el uso de un mezclador estático seguido de la cromatografía de intercambio catiónico seguida de la filtración de virus.

En este ejemplo, se produce un anticuerpo monoclonal basado en CHO (MAb05) en un biorreactor semicontinuo. Aproximadamente 5,5 l de cultivo celular se procesaron con un filtro de profundidad primario D0HC (EMD Millipore) de 0,054 m² y luego se clarificaron además con un filtro de profundidad secundario X0HC (EMD Millipore) de 0,054 m², donde ambos se procesan con un flujo de 10 LMH, lo que hace que la carga sea de aproximadamente 100 l/m².

El efluente de la filtración en profundidad se pone en contacto con una solución de NaCl 5 M en una relación de 1:10 que luego se mezcla a través de un mezclador estático seguido de un filtro estéril. La presión se supervisa antes de cada filtro de profundidad y después del filtro estéril (Figura 3). Después del mezclador estático, la solución se pasa a través de un filtro estéril SHC (EMD Millipore) hasta una carga final de 3200 l/m². El efluente del filtro estéril se dirige a un tanque de compensación que se supervisa con una celda de carga para determinar la cantidad filtrada. Se recolectan muestras de un ml justo antes de cada ciclo de carga en la cromatografía continua de múltiples columnas (CMC) de Proteína A (Figura 4). Después de procesar y recolectar aproximadamente 70 ml de cultivo celular en un tanque de compensación, la solución clarificada se carga simultáneamente en la siguiente etapa para la captura de Proteína A.

La captura de Proteína A consiste en dos columnas de Proteína A que se ejecutan en un Akta Explorer 100 modificado. Las columnas de Proteína A tienen 10 ml de medio ProSep Ultra Plus Protein A empaquetado en columnas de cromatografía Vantage-L (EMD Millipore) de 1,6 cm de DI hasta alturas de lecho de 10,25 y 10,85 cm. Las columnas se equilibran con PBS 1X, NaCl 0,5 M para 5 volúmenes de columna (todos los volúmenes de columna se basan en la columna más pequeña). A lo largo de la ejecución, la velocidad de flujo de carga se configura para tener un tiempo de residencia de carga de ~ 1 minuto. Durante la carga inicial, ambas columnas se colocan en serie, donde el efluente de la columna primaria se carga directamente en la columna secundaria hasta alcanzar un volumen de carga específico. Después de pasar un volumen de carga específico sobre las columnas, se detiene la alimentación y se pasan 2 volúmenes de columna (VC) del tampón de equilibrio a través de la columna primaria a la columna secundaria. Luego, la columna primaria se coloca para someterse a lavado, elución, limpieza y reequilibrio, mientras que la columna secundaria se carga como columna primaria. Después del reequilibrio de la primera columna, la columna se mueve a la posición secundaria para estar en serie con la que es ahora la columna primaria. Esta serie de eventos se repite con cada columna, que toma la posición primaria después de que la columna de la posición primaria original se cargue a un volumen establecido. La primera columna se carga un total de tres veces y la segunda columna se carga dos veces. Las eluciones de cada columna se recolectan en un vaso de precipitados con mezcla, mediante el uso de un activador UV para controlar el tiempo de inicio y finalización de la elución.

Después de recolectar y mezclar las dos primeras eluciones, la solución se bombea hacia un tanque de compensación y se mezcla con una solución 2 M de Tris y se procesa a través de dos mezcladores estáticos para aumentar el pH a pH 8,0, donde el pH de la solución resultante es medido inmediatamente después de los mezcladores estáticos. Luego, la solución con el pH ajustado se procesa a través de un filtro de profundidad A1HC

(EMD Millipore) seguido de una columna Omnifit de 1 cm de DI empaquetada con carbón activado. Luego, el efluente de la columna de carbón activado se hace fluir continuamente a través de un dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, ChromaSorb™) (EMD Millipore) hasta una carga de 4 kg de MAb/l de ChromaSorb™. El efluente del intercambiador aniónico ChromaSorb™ luego se mezcla con ácido acético 1 M, luego se procesa a través de un mezclador estático para bajar el pH a pH 5,5. La solución de pH ajustado del mezclador estático luego se hace fluir a través de un dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico que se usa como filtro previo, seguido de la filtración de virus mediante el uso de la membrana Viresolve® Pro (EMD Millipore). El efluente del filtro de virus se dirige a un tanque de depósito y se muestrea.

5

Este proceso de purificación proporciona una solución final que cumple con todos los objetivos de la purificación, específicamente HCP <1 ppm, agregados <1 % con una recuperación de mAb05 > 60 % para el proceso general.

10

Ejemplo 2: Proceso para purificar un anticuerpo monoclonal

En este ejemplo representativo, la purificación de un anticuerpo monoclonal se logra mediante el uso de un proceso de purificación, donde diversas operaciones unitarias se conectan en la secuencia que se describe más abajo.

15

El ejemplo representativo que se describe más abajo incluye las siguientes etapas realizadas en la secuencia enumerada: clarificación mediante el uso de un polímero sensible al estímulo después de la centrifugación; poner en contacto el sobrenadante con una sal; la cromatografía de unión y elución de Proteína A mediante el uso de la cromatografía continua de múltiples columnas que emplea dos unidades de separación; el ajuste del pH de la salida mediante el uso de uno o más mezcladores estáticos; y la purificación de flujo continuo que emplea la filtración en profundidad seguida de carbón activado seguido de la cromatografía de intercambio aniónico seguida de un ajuste del pH mediante el uso de un mezclador estático seguido de la cromatografía de intercambio catiónico seguida de la filtración de virus.

20

25

En este ejemplo, se produce un anticuerpo monoclonal basado en CHO (MAb05) en un biorreactor semicontinuo. Se ponen en contacto un total de 7 litros de cultivo celular con una solución de un polímero sensible al estímulo (polialilamina modificada; sensible a la adición de sal) hasta una concentración final de polímero de 0,2 % v/v. El cultivo celular se mezcla con la solución de polímero sensible al estímulo durante aproximadamente 10 minutos. Se añaden alrededor de 175 ml de solución K_2HPO_4 2 M y el cultivo celular se mezcla durante 10 minutos adicionales. Luego se eleva el pH a 7,0 mediante la adición de base Tris 2 M y se mezcla durante 15 minutos. Luego, la solución se centrifuga en alícuotas de 2 l a 4500 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se decanta y retiene. Los sólidos se desechan. El sobrenadante del cultivo celular se mezcla y luego se mezcla con NaCl 5 M en una relación de 1:10 en un modo discontinuo con agitación continua. La conductividad final de la solución se mide en este punto y es de 55 ± 5 mS/cm. La solución resultante se filtra de forma estéril a través de un filtro Express SHC de 0,22 μ m (EMD Millipore). La solución filtrada estéril es el material de carga para la cromatografía de Proteína A.

30

35

La etapa de captura de Proteína A consiste en dos columnas de Proteína A que se ejecutan en un Akta Explorer 100 modificado. Las columnas de Proteína A tienen 10 ml de medio ProSep Ultra Plus Protein A empaquetado en una columna de cromatografía Vantage-L (EMD Millipore) de 1,6 cm de DI hasta alturas de lecho de 10,25 y 10,85 cm. Las columnas se equilibran con TBS 1X, NaCl 0,5 M para 5 volúmenes de columna, VC (todos los volúmenes de columna se basan en la columna más pequeña). A lo largo de la ejecución, la velocidad de flujo de carga se configura para tener un tiempo de residencia de carga de alrededor de un minuto.

40

45

Durante la carga inicial, ambas columnas se colocan en serie, donde el efluente de la columna primaria se carga directamente en la columna secundaria hasta alcanzar un volumen de carga específico. Después de pasar un volumen de carga específico sobre las columnas, se detiene la alimentación y se pasan dos VC del tampón de equilibrio a través de la columna primaria a la columna secundaria. Luego, la columna primaria se coloca para someterse a lavado, elución, limpieza y reequilibrio, mientras que la columna secundaria se carga como columna primaria. Después del reequilibrio de la primera columna, esa columna se mueve a la posición secundaria para quedar en serie con la que es ahora la columna primaria. Esta serie de eventos se repite con cada columna, que toma la posición primaria después de que la columna de la posición primaria original se cargue a un volumen establecido. Cada columna se carga un total de siete veces. Las eluciones de cada columna se recolectan con un colector de fracciones, mediante el uso de un activador UV para controlar el tiempo de inicio de la elución y se recolectan hasta un volumen constante de aproximadamente 3,5 VC.

50

55

La purificación de flujo continuo consiste en seis etapas principales: filtro de profundidad; carbón activado; cromatografía de intercambio aniónico; ajuste de pH en línea; cromatografía de intercambio catiónico; y filtración de virus.

60

La Figura 5 ilustra el orden en que se conectan estas etapas. Las bombas y sensores necesarios, por ejemplo, sensores de presión, conductividad y UV también se muestran en el esquema.

Todos los dispositivos se humedecen individualmente en una estación diferente y luego se ensamblan como se muestra en la Figura 5. Los dispositivos se humedecen y se tratan previamente de acuerdo con el protocolo del

65

fabricante o como se describe en la presente descripción. Brevemente, el filtro de profundidad (A1HC) se enjuaga con 100 l/m² de agua seguido de 5 volúmenes de tampón de equilibrio 1 (EB1: tampón de elución de Proteína A ajustado a pH 7,5 con base Tris 1 M, pH 11). Se empaquetan 10 ml de carbón activado en una columna Omnifit de 2,5 cm de DI. La columna se enjuaga con 10 VC de agua y luego se equilibra con EB1 hasta que el pH se estabiliza a pH 7,5. Se apilan 1,2 ml de membrana de intercambio aniónico (7 capas) en un dispositivo Swinex de 47 mm de diámetro. El dispositivo se humedece con agua a 12,5 VC/min durante al menos 10 min, seguido de 5 volúmenes de dispositivo (VD) de EB1. Se usa un mezclador estático helicoidal desechable (Koflo Corporation, Cary, IL) con 12 elementos para realizar los ajustes de pH en línea. Se humedece un dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico de 3 capas (volumen de membrana de 0,12 ml) con 10 VD de agua, seguido de 5 VD de tampón de equilibrio 2 (EB2: EB1 ajustado a pH 5,0 mediante el uso de ácido acético 1 M). El dispositivo se trata además con 5 VD de EB2 + NaCl 1 M y luego se equilibra con 5 VD de EB2. Un dispositivo de filtración de virus Viresolve® Pro de 3,1 cm² se humedece con agua presurizada a 30 psi durante al menos 10 minutos. Luego, la velocidad de flujo se supervisa cada minuto hasta que la velocidad de flujo permanece constante durante 3 minutos consecutivos. Después de que todos los dispositivos se humedecen y equilibran, se conectan como se muestra en la Figura 5.

El EB1 se ejecuta a través de todo el sistema hasta que se estabilizan todas las lecturas de presión y pH. Después del equilibrio, la alimentación (es decir, el eluido de Proteína A ajustado a pH 7,5) se somete a una purificación de flujo continuo. Durante la ejecución, las muestras se recolectan antes del tanque de compensación y después de Viresolve® Pro para supervisar la concentración de MAb y los niveles de impurezas (por ejemplo, HCP, ADN, Proteína A lixiviada y agregados). Después de que se procesa la alimentación, el sistema se enjuaga con 3 volúmenes de dispositivo de EB1 para recuperar cualquier MAb que aún permanezca en los diversos dispositivos, así como también en las líneas de conexión entre los dispositivos.

La Figura 6 representa las lecturas de presión después del filtro de profundidad, el carbón activado y Viresolve® Pro en la purificación de flujo continuo. Generalmente, un aumento en la presión indica el ensuciamiento de las columnas del filtro. En particular, la columna de carbón activado permanece bastante protegida de cualquier precipitado debido al filtro de profundidad usado antes del carbón activado. La presión de Viresolve® Pro se eleva lentamente con el tiempo, pero está muy por debajo del límite operativo máximo (50 psi).

El avance de las HCP en función del tiempo, medida después del dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico está por debajo del objetivo de 10 ppm. Las HCP finales en la mezcla de muestras de Viresolve® Pro son <1 ppm (Tabla 1). La Proteína A lixiviada promedio en las fracciones de elución es de 32 ppm. La Proteína A lixiviada en la mezcla de muestras de Viresolve® Pro es de 4 ppm. Los agregados se reducen del 1 % al 0,4 %.

Los resultados del experimento se resumen en la Tabla II que aparece más abajo.

Tabla II

Propiedad medida	Resultados
Rendimiento de MAb (%) después de la purificación de flujo continuo, donde el valor inicial del 100 % es la cantidad después de la CMC de Proteína A	97,8 %
Promedio de HCP medido después de la elución de la CMC de Proteína A en relación con el medido después de la filtración de virus (ppm)	172 → 1,75
Promedio de agregados después de la elución de la CMC de Proteína A en relación con los agregados después de la filtración de virus (%)	1 → 0,4 %
Promedio de Proteína A lixiviada después de la elución de la CMC de Proteína A en relación con la Proteína A lixiviada después de la filtración de virus (ppm)	32 → 4
Capacidad de filtración de virus (kg/m ²)	> 6,1
Factor de dilución de MAb medido por la relación de la concentración de MAb después de la CMC de Proteína A y después de la filtración de virus	1,15x

Ejemplo 3: Proceso de purificación de flujo continuo después de la cromatografía discontinua de Proteína A

En este experimento representativo, una solución de anticuerpo monoclonal previamente purificada mediante una cromatografía discontinua de Proteína A se purifica además mediante el uso de la purificación de flujo continuo para cumplir con los objetivos finales de pureza y rendimiento. Esto se hace mediante la realización de las siguientes etapas a manera de flujo continuo: carbón activado; cromatografía de intercambio aniónico; cambio de pH en línea; cromatografía de intercambio catiónico y filtración de virus.

La configuración, el equilibrio y la ejecución son similares a los del Ejemplo 2, excepto por algunas modificaciones menores. El material de partida es un eluido de Proteína A de un proceso discontinuo de Proteína A. Específicamente, la alimentación de MAb procesada para esta ejecución es de 102 ml de 13,5 mg/ml de MAb05 a una velocidad de flujo de 0,6 ml/min. En este estudio no se usa un filtro de profundidad, ya que la alimentación se filtra a través de un filtro estéril de 0,22 µm antes de realizar la purificación de flujo continuo. Se usa una columna de carbón activado de 2,5 ml que corresponde a una carga de 0,55 kg/l. Dos dispositivos de cromatografía de

intercambio aniónico (0,2 y 0,12 ml) se conectan en serie para obtener una carga de 4,3 kg/l. Dos dispositivos de cromatografía de intercambio catiónico de 1,2 ml (7 capas de la membrana en cada dispositivo) se conectan en paralelo para manejar los agregados. La carga de MAb en los dispositivos de cromatografía de intercambio catiónico es de alrededor de 570 mg/ml. Para la filtración de virus se usa un dispositivo Viresolve® Pro de 3,1 cm².

El avance de las HCP en función de la carga después del dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico está por debajo del objetivo de 10 ppm (Figura 7). Las HCP finales en la mezcla de muestras de Viresolve® Pro son <1 ppm (Tabla 2). Los agregados se reducen del 5 % al 1,1 % mediante el dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico (Figura 8).

Los resultados del experimento se resumen en la Tabla III que aparece más abajo.

Tabla III

Propiedad medida	Resultados
Rendimiento de MAb (%) después de la purificación de flujo continuo, donde el valor inicial del 100 % es la cantidad después de la cromatografía discontinua de Proteína A	92 %
Promedio de HCP medido después de la elución de la cromatografía discontinua de Proteína A en relación con el medido después de la filtración de virus (ppm)	591 → 0,61
Promedio de agregados después de la elución de la cromatografía discontinua de Proteína A en relación con los agregados después de la filtración de virus (%)	~ 5 → 1,1 %
Capacidad de filtración de virus (kg/m ²)	> 3,7
Factor de dilución de MAb medido por la relación de la concentración de MAb después de la cromatografía discontinua de Proteína A y después de la filtración de virus	1,25x

La Figura 9 muestra las lecturas de presión antes del carbón activado y Viresolve® Pro. Generalmente, el aumento de la presión implica que los filtros se han ensuciado. En este caso, hay un aumento modesto (alrededor de 5 psi) en la presión en el caso del carbón activado. La presión de Viresolve® Pro se eleva lentamente con el tiempo, pero está muy por debajo del límite operativo máximo (50 psi).

Como se muestra en la Figura 10, el pH después del ajuste permanece en el punto de ajuste objetivo de pH 4,9, excepto durante el arranque. Las subidas de pH se pueden amortiguar mediante el uso de un tanque de compensación después del ajuste de pH en línea y antes de bombear al dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico.

Ejemplo 4: Clarificación conectada a la cromatografía de Proteína A

En este ejemplo representativo, la clarificación se conecta a la cromatografía de Proteína A de manera continua.

En este experimento, la velocidad de flujo que se usa para la filtración en profundidad se determina por el tiempo de residencia usado para la cromatografía de Proteína A, que sigue a la filtración en profundidad. La velocidad de flujo usada en este ejemplo representativo es más lenta que la usada en la filtración en profundidad convencional, lo que resulta en una mayor eliminación de HCP en la salida recuperada después de la cromatografía de Proteína A.

Se obtiene una alimentación de cultivo celular de anticuerpo monoclonal (MAb04) y se divide en tres porciones iguales. La primera porción (muestra #1 en la Tabla IV) se clarifica mediante el uso de filtros de profundidad primarios y secundarios Millistak+® D0HC y X0HC (EMD Millipore) con una relación de área de filtro de 1:1 y una velocidad de flujo de 100 litros/m² /hora (LMH), que es un flujo típico usado en procesos de clarificación estándar. El efluente se prueba para determinar la concentración de MAb y la cantidad de HCP. La segunda porción de la alimentación de cultivo celular (muestra #2) también se clarifica con el mismo tipo y relación de filtros, pero con una velocidad de flujo de 10 LMH. Esta velocidad de flujo se basa en un tiempo de residencia de seis minutos de la columna de cromatografía de Proteína A, que sigue a la clarificación. En ambos casos, se procesa la misma cantidad de material, lo que corresponde a una capacidad de procesamiento de alrededor de 100 l/m², y las dos muestras se tratan de la misma manera.

Ambos fluidos de cultivo celular clarificados se someten a una cromatografía de unión y elución de Proteína A, lo que resulta en las muestras #3 y #4 de la Tabla IV, donde la clarificación y la cromatografía de Proteína A se realizan por separado (es decir, no están conectadas). La muestra #4, relacionada con una velocidad de flujo más lenta, se pierde y, por lo tanto, no se puede analizar.

La tercera porción de la alimentación de cultivo celular (muestra #5) se procesa a través de un ensamblaje que tiene el efluente de los dos filtros de profundidad cargados continuamente en una columna de cromatografía de Proteína A (es decir, donde se conectan la clarificación y la cromatografía de Proteína A). Se usan las mismas condiciones cromatográficas anteriores. Todos los eluidos de Proteína A se prueban para determinar la concentración de MAb y

la cantidad de HCP. En el caso de la muestra #5, el tiempo de residencia de seis minutos de la cromatografía de Proteína A determina la velocidad de flujo de alrededor de 10 LMH para la clarificación.

5 Todos los resultados se muestran en la Tabla IV. Los resultados indican que los niveles de HCP son 2 veces más bajos después de una clarificación lenta (es decir, la muestra #2 en relación con la muestra #1). No se ha informado una comparación directa de las muestras correspondientes después de la cromatografía de Proteína A debido a la pérdida de muestra (es decir, la muestra #4). Una comparación de los resultados relacionados con la muestra #5 en relación con la muestra #3 sugiere que realizar la clarificación y la cromatografía de Proteína A de manera continua y conectada proporciona una mejora de 8 veces en la pureza del MAb en comparación con la pureza cuando la clarificación y la cromatografía de Proteína A se ejecutan por separado. La comparación de los valores LRV estimados documenta la diferencia.

Tabla IV

#	Muestra	MAb (g/l)	HCP (ng/ml)	HCP (ppm)	LRV
1	100 LMH clarificado	1,19 (80 %)	256,894	221,426	
2	10 LMH clarificado	1,01 (69 %)	118,114	117,421	
3	100 LMH clarificado y purificado con Proteína A	9,03	7,553	837	2,4
4	10 LMH clarificado y purificado con Proteína A	no probado			
5	10 LMH clarificado y purificado con Proteína A de manera conectada	7,94	808	102	(3,1)

Ejemplo 5: Clarificación mediante el uso de un polímero sensible al estímulo

25 En este experimento representativo, la clarificación se realiza mediante el uso de un polímero sensible al estímulo mediante el uso de dos procesos diferentes.

30 En un proceso, un polímero sensible al estímulo se añade directamente a un biorreactor (que puede ser un biorreactor desechable o de un solo uso) que contiene un cultivo celular que expresa una molécula diana. En un segundo proceso, se bombea un cultivo celular fuera de un biorreactor y se pone en contacto con un polímero sensible al estímulo mediante el uso de uno o más mezcladores estáticos en línea.

35 En el caso del proceso relacionado con la realización de la clarificación directamente en un biorreactor, se añaden 60 ml del polímero sensible al estímulo, al 10 % en peso, en un biorreactor desechable de 3 l que contiene un cultivo celular y se mezcla durante al menos 5 minutos. Se añaden 75 ml de K_2HPO_4 2 M al biorreactor y se mezclan durante al menos 5 minutos. Se añade base Tris 2 M al biorreactor mientras se mezcla para aumentar el pH entre 7 y 7,3 (aproximadamente 50-100 ml). Se permite que la solución se mezcle durante al menos 1 minuto y luego se bombea fuera del biorreactor y se carga directamente en un filtro de profundidad a una velocidad de 100 LMH para eliminar el precipitado.

45 En el caso del proceso relacionado con el uso de un mezclador estático en línea, el cultivo celular se bombea fuera del biorreactor a una velocidad de 93,5 LMH a una válvula o conector donde se pone en contacto con una corriente del polímero sensible al estímulo que fluye a una velocidad de 1,9 LMH. La corriente combinada luego fluye hacia un mezclador estático en línea del tamaño apropiado para proporcionar una mezcla eficiente. Luego, la corriente fluye hacia una segunda válvula o conector donde se pone en contacto con un estímulo para que el polímero fluya a una velocidad de 2,3 LMH. La corriente combinada fluye hacia un segundo mezclador estático del tamaño apropiado para proporcionar una mezcla eficiente. Luego, la corriente fluye hacia una tercera válvula o conector donde se pone en contacto con una corriente de base Tris 2 M que fluye a una velocidad aproximada de 2,3 LMH (el flujo del Tris se ajusta para mantener un pH de 7-7,3 de la corriente combinada). La corriente combinada fluye hacia un tercer mezclador estático que tiene el tamaño apropiado para proporcionar una mezcla eficiente. Esta corriente luego se carga directamente en uno o más filtros de profundidad para eliminar el precipitado.

55 Se observa que diferentes alimentos pueden ser más sensibles al pH o pueden interactuar con un polímero sensible al estímulo de manera diferente. Los rendimientos pueden maximizarse al tener la capacidad de tratar los alimentos en un biorreactor, en línea o puede usarse una combinación de los dos.

60 El uso de un polímero sensible al estímulo, como se describe en la presente descripción, resulta en un mejor desempeño en la etapa del proceso de cromatografía de unión y elución (por ejemplo, la etapa de cromatografía de Proteína A), que sigue a la etapa de clarificación. Además, se observa que el método descrito en este ejemplo representativo resulta en un aumento del número de ciclos cromatográficos de la siguiente etapa de cromatografía de unión y elución, en relación con los esquemas de clarificación que no implican el uso de un polímero sensible al estímulo. Por último, el eluido obtenido posterior a la etapa cromatográfica de unión y elución parece exhibir menos generación de turbidez con el cambio de pH, cuando se usa un polímero sensible al estímulo anterior a la etapa de cromatografía de unión y elución.

65

Ejemplo 6: Efecto de la clarificación mediante precipitación, sobre el desempeño de la elución en la cromatografía de Proteína A

5 En este experimento representativo, se investiga el efecto del tipo de clarificación realizada en un cultivo celular basado en CHO que produce MAb04, sobre el desempeño de la elución en la cromatografía de Proteína A.

10 Un único lote de cultivo celular se divide uniformemente en tres alícuotas. Una alícuota se somete a clarificación mediante el uso del ácido caprílico; otra alícuota se somete a clarificación mediante el uso de un polímero sensible al estímulo (es decir, polialilamina modificada); y la tercera alícuota se deja sin tratar.

15 Después de la precipitación con el ácido caprílico o el polímero sensible al estímulo, los sólidos se eliminan mediante el uso de la centrifugación. El cultivo celular sin tratar también se centrifuga después de mezclarlo durante el mismo tiempo que los dos cultivos tratados. Todos se esterilizan por filtración antes de su uso.

20 Para cada solución clarificada, se mide la conductividad de las soluciones y se ajusta con NaCl 5 M hasta que la conductividad alcanza alrededor de 54 mS/cm. La concentración promedio del NaCl añadido es de aproximadamente 0,5 M para todas las soluciones. Las soluciones de cultivo celular de mayor conductividad se esterilizan por filtración antes de cargarlas en columnas de cromatografía de Proteína A separadas.

25 Para realizar la cromatografía de Proteína A para cada solución de alimentación, se empaquetan tres columnas con medio ProSep Ultra Plus, una columna con 4 ml de medio empaquetado y las otras dos con 4,24 ml de medio empaquetado en columnas OmniFit de 10 mm de diámetro interno. Las alturas del lecho de la columna son 5,1 y 5,4 cm para las columnas de 4 ml y 4,24 ml, respectivamente.

30 Todos los experimentos de cromatografía se realizan en un Äkta Explorer 100 (tratado con caprílico y polímero sensible al estímulo) o un Äkta Avant 25 (sin tratar). Antes de la primera carga, cada columna se lava con al menos cinco volúmenes de columna (VC) de ácido fosfórico 0,15 M. Todas las ejecuciones de cromatografía se realizan mediante el mismo procedimiento básico. Las columnas se equilibran con 5 VC de TBS 1X + NaCl 0,5 M, seguido de una carga de ~ 30 g de MAb04 por litro de medio empaquetado. La solución de carga se enjuaga con 2 VC de tampón de equilibrio seguido de un lavado de 4 VC con Tris 25 mM, pH 7,0. Después del lavado de la columna, el producto (MAb04) se eluye de la columna con 5 VC de glicina HCl 25 mM, ácido acético 25 mM, pH 2,5. La elución se recolecta mediante el uso del colector de fracciones del sistema, la recolección comienza con el uso de un activador UV y se recolecta un volumen constante de 4 VC. La columna se limpia con 4 VC de ácido fosfórico 0,15 M seguido de una etapa de reequilibrio de 10 VC con tampón de equilibrio.

35 La purificación de Proteína A de las diferentes muestras clarificadas se realiza durante doce (sin tratar) y nueve (tratadas con ácido caprílico y polímero sensible al estímulo) ciclos sucesivos.

40 Las Figuras 11, 12 y 13 representan los cromatogramas superpuestos para todos los experimentos, en cada caso se muestran, en secuencia, los picos de carga, elución y limpieza. Es evidente que el pico de elución sin tratamiento con el polímero sensible al estímulo tiene un rastro visible y significativo en comparación con los picos de elución del cultivo celular tratado con el polímero sensible al estímulo, lo que sugiere una elución menos eficiente cuando no se usó el polímero sensible al estímulo.

45 Además, la absorbancia de la solución de carga es notablemente más baja para el cultivo celular tratado con el polímero sensible al estímulo en comparación con el cultivo celular si tratar, donde la absorbancia se reduce en 0,4 - 0,5 unidades de absorbancia (AU), lo que sugiere un menor problema de impurezas para la columna.

50 Después de la elución, el pH se eleva a 5,0 para ambos conjuntos de muestras, luego se eleva además hasta un pH 7,5. A pH 5,0 no hay turbidez visible de las soluciones. Sin embargo, a pH 7,5, todas las muestras de elución exhiben un aumento de los niveles de turbidez, con niveles significativamente más altos (99 - 644 NTU) para las muestras sin tratar, mientras que la turbidez de la mezcla de muestras de elución tratada con el polímero sensible al estímulo varía de 69,5 a 151 NTU, que es significativamente menor en relación con las muestras sin tratar.

55 Ejemplo 7: Eliminación simultánea de impurezas solubles e insolubles del eluido de captura por afinidad mediante el uso de carbón activado

60 En este experimento representativo, se demostró que el carbón activado, cuando se empacaba con medios de celulosa, era capaz de eliminar tanto impurezas insolubles (es decir, partículas) como solubles de un eluido de la etapa de cromatografía de unión y elución de Proteína A (es decir, etapa de captura).

65 En muchos procesos convencionales usados en la industria hoy en día, a menudo se usa un filtro de profundidad después de la etapa de captura por afinidad de Proteína A para eliminar impurezas insolubles (es decir, partículas) antes de la siguiente etapa, que típicamente es una etapa de cromatografía de unión y elución de intercambio catiónico.

En los procesos descritos en la presente descripción, se evita el uso de un filtro de profundidad después de la cromatografía de unión y elución de Proteína A. En particular, mediante el uso de carbón activado después de la etapa de cromatografía de unión y elución de Proteína A, no solo se evita la necesidad de la etapa de cromatografía de unión y elución de intercambio catiónico, sino que también se elimina la necesidad de usar un filtro de profundidad. Esto ofrece muchas ventajas que incluyen, por ejemplo, la reducción del costo general, el tiempo del proceso, así como también el espacio físico general debido a la eliminación de etapas que se usan típicamente.

Como se demuestra en la presente descripción, el uso de carbón activado conduce a la eliminación simultánea de impurezas solubles (por ejemplo, HCP), así como también de impurezas insolubles (por ejemplo, partículas).

Un cultivo celular del anticuerpo monoclonal MAb04 se somete a cromatografía de afinidad de Proteína A y el pH de la mezcla de muestras de elución se ajusta de pH 4,8 a pH 7,5, con la adición, gota a gota, de 1,0 M de base Tris, para cambiar las condiciones de la solución adecuadas para la siguiente etapa en el proceso. Sin embargo, elevar el pH de la solución aumenta la turbidez, que en este caso se mide en 28,7 NTU. Esta solución se denomina, más abajo, como eluido de Proteína A MAb04.

Se corta una sección circular de una lámina de medio de celulosa y carbón activado de 5/8 de pulgada de diámetro y 5 mm de espesor y se carga cuidadosamente en columnas de cromatografía Omnifit[®] de 15 mm de diámetro (SKU: 006BCC-25-15-AF, Diba Industries, Inc, Danbury, CT 06810 Estados Unidos), lo que resulta en un volumen de columna de 0,89 ml. La columna se enjuaga con Tris 25 mM pH 7. Alrededor de 40 ml del eluido de Proteína A MAb04 turbio se pasan a través de la columna a una velocidad de flujo de 0,20 ml/min, lo que resulta en un tiempo de residencia de 4,5 minutos. Se recolectan cuatro fracciones de 10 ml. Cada fracción individual, así como también la mezcla de muestras combinada, compuesta por las cuatro fracciones, se evalúa para determinar la turbidez y se analiza para determinar las concentraciones de HCP y MAb. El análisis de HCP se realiza mediante el uso de un kit ELISA, comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, Estados Unidos, número de catálogo F550, siguiendo el protocolo del fabricante del kit. La concentración de MAb se mide mediante el uso de un sistema de HPLC Agilent equipado con una columna analítica Poros[®] A Protein A. Los resultados se resumen en la Tabla V.

Los resultados muestran que el carbón activado es inesperadamente efectivo para la eliminación simultánea de las impurezas insolubles (es decir, partículas), así como también de las impurezas solubles (es decir, HCP) del eluido de Proteína A. La turbidez del eluido de Proteína A se reduce de 28,7 NTU a 9,9 NTU, mientras que la concentración de HCP se reduce de 758 ppm a 104 ppm.

Este resultado demuestra que el carbón activado, cuando se empaqueta con medios de celulosa, puede usarse para eliminar tanto las impurezas solubles como las insolubles.

Tabla V

volumen cargado (ml)	carga de carbón activado (kg/l)	Turbidez (NTU)	MAb (mg/ml)	HCP (ng/ml)	HCP (ppm)	LRV de HCP
control	-	28,7	10,38	7,872	758	-
10	0,13	8,8	9,76	130	13	1,77
20	0,25	10,3	10,53	850	81	0,97
30	0,38	10,3	10,55	1,660	157	0,68
40	0,50	10,6	10,38	2,333	225	0,53
40 (mezcla de muestras)	0,50	9,9	10,59	1,098	104	0,86

Ejemplo 8: Efecto del tiempo de residencia en la eliminación de impurezas mediante carbón activado

En este experimento representativo, se demostró que cuando se usa carbón activado en un proceso continuo, como se describe en la presente descripción, resulta en una eliminación de impurezas superior en relación con cuando no se usa de manera continua. En particular, cuando se emplea carbón activado en un proceso continuo, como se describe en la presente descripción, donde, por lo general, está en comunicación fluida con la etapa anterior de cromatografía de unión y elución de Proteína A y con un medio posterior de cromatografía de intercambio aniónico, la muestra fluye a través del carbón activado a una velocidad de flujo que es más lenta (es decir, que tiene un tiempo de residencia más largo) en relación con cuando el carbón activado se usa por separado como una operación independiente.

En este ejemplo, el eluido de MAb04 purificado con Proteína A se somete además a una etapa de purificación de flujo continuo que emplea carbón activado (CA) y un dispositivo de membrana de cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, un dispositivo ChromaSorb[™]) configurado en serie, a cuatro velocidades de flujo diferentes. Se determina que la concentración de anticuerpos en el alimento es de 7,5 g/l; se determina que la concentración de HCP es de 296 ppm. El experimento se realiza a pH 7,0. El carbón activado, grado Nuchar HD, se obtiene de MeadWestVaco. Se empaqueta en una columna Omnifit de vidrio para un volumen de lecho de 0,8 ml. Un

dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico con un volumen de membrana de 0,08 ml se conecta en serie a la columna de CA. Las velocidades de flujo se eligen de modo que el tiempo de residencia (TR) en el CA sea de 1, 2, 4 o 10 minutos. La carga de MAb en el CA y el dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico se mantienen constantes en 0,5 kg/l y 5 kg/l, respectivamente, para las 4 ejecuciones diferentes (es decir, con los cuatro tiempos de residencia diferentes indicados anteriormente).

Las muestras del avance en el dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico se recolectan y analizan para determinar las concentraciones de MAb y HCP. En la Figura 14 se muestra el avance de las HCP en función de la carga de MAb en el dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico en los 4 tiempos de residencia diferentes en el CA mencionados anteriormente.

Como se demuestra en la Figura 14, las velocidades de flujo más bajas en el CA (es decir, tiempos de residencia más largos) proporcionan una mejor pureza con las mismas cargas de MAb. Alternativamente, puede lograrse la misma pureza con un volumen más pequeño de CA y el dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico a una velocidad de flujo más lenta. Por ejemplo, el objetivo de pureza de ~ 1 ppm de HCP puede lograrse mediante el uso de una carga de 2 kg/l en el dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico (y 0,2 kg/l en el CA), al operar con un tiempo de residencia de 1 minuto. En particular, puede lograrse la misma pureza mientras se opera con un tiempo de residencia más largo de 10 minutos (es decir, una velocidad de flujo más lenta) con una carga significativamente mayor de 5 kg/l en el dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico (y 0,5 kg/l en el CA). Este hallazgo destaca una posible ventaja económica al usar menos material de purificación consumible para lograr la misma pureza cuando se reduce la velocidad de flujo.

Ejemplo 9: Ventaja de usar un tanque de compensación en la etapa del proceso de purificación de flujo continuo

En este experimento representativo, se demuestran una o más ventajas de usar un tanque de compensación en la etapa del proceso de purificación de flujo continuo, como se describe en la presente descripción.

Típicamente, la cromatografía de intercambio catiónico de flujo continuo requiere que la muestra tenga un pH de alrededor de 5. En consecuencia, el pH de la muestra debe cambiarse de un pH alrededor de neutro a un pH de alrededor de 5,0, a medida que fluye de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico a la etapa de cromatografía de intercambio catiónico, al realizar la purificación de flujo continuo.

Mientras que el cambio de pH puede lograrse mediante el uso de un mezclador estático en línea, este ejemplo demuestra que es ventajoso usar, adicionalmente, un tanque de compensación. En consecuencia, el flujo de la muestra es el siguiente: etapa de cromatografía de intercambio aniónico a un mezclador estático en línea a un tanque de compensación a la etapa de cromatografía de intercambio catiónico.

Se observa que, si solo se usa un mezclador estático en línea para cambiar las condiciones de pH entre las etapas de cromatografía de flujo continuo de intercambio aniónico y de intercambio catiónico, se ve un aumento repentino (es decir, una subida), medido mediante el uso de una sonda de pH. Se entiende que la subida del pH se observa debido a las diferencias químicas en la composición de la muestra y la del tampón que se añade para cambiar el pH. Esta subida del pH es inconveniente ya que resulta en que la muestra se procese durante un tiempo mayor que el que se requiere para obtener resultados óptimos. Este ejemplo demuestra que esta subida del pH puede reducirse o eliminarse mediante el uso de un tanque de compensación después del mezclador estático en línea y antes de que la muestra entre en contacto con la etapa de cromatografía de intercambio catiónico, como se muestra en la Figura 15.

Como se muestra en la Figura 15, se observa una subida del pH de alrededor de pH 6,5 sin el uso de un tanque de compensación. Sin embargo, cuando se usa un tanque de compensación, como se describe en la presente descripción, el pH cae por debajo de pH 5,3, que está más cerca del pH conveniente para la etapa de cromatografía de intercambio catiónico posterior.

Ejemplo 10: Ejecutar la etapa del proceso de purificación de flujo continuo de manera continua no es perjudicial para la pureza del producto

En este experimento representativo, se demuestra que ejecutar un proceso de purificación de flujo continuo de manera continua no es perjudicial para la pureza del producto. En otras palabras, al comparar la pureza del producto de una etapa del proceso de purificación de flujo continuo, ejecutado de manera continua, con uno donde las etapas individuales se realizan por separado, se muestra que no hay ningún efecto perjudicial sobre la pureza del producto.

Este ejemplo demuestra que al conectar el carbón activado y un dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, ChromaSorb™) en serie a un dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico, que actúa como un filtro de virus previo y un dispositivo de filtración de virus, y al operar toda la etapa del proceso de purificación de flujo continuo, continuamente, resulta en una capacidad similar del filtro de virus, en comparación con cuando el carbón activado y el dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico están desacoplados del dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico y del dispositivo de filtración de virus.

La configuración experimental para este experimento se muestra en la Figura 16. La Opción 1 en la Figura 16 se refiere al proceso continuo, donde la muestra del tanque de compensación (presente después del dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico) se alimenta directamente hacia un dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico seguido de un dispositivo de filtración de virus. La Opción 2 en la Figura 16 se refiere a un proceso discontinuo donde la muestra se mezcla después del carbón activado y el dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico, y después de un tiempo, se procesa a través de un dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico y el dispositivo de filtración de virus.

En este experimento, la muestra inicial es el eluido de cromatografía de unión y elución de Proteína A, que tiene una concentración de HCP de 250 ppm. Se observa que después del dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico y carbón activado, los niveles de HCP se reducen a alrededor de 4 ppm.

En el caso del proceso discontinuo (Opción 2), se observa que la concentración final de HCP después de la filtración de virus es de alrededor de 1 ppm; mientras que en el caso del proceso continuo (Opción 1), la concentración de HCP después de la filtración de virus fue de alrededor de 2 ppm, ambos valores están en el límite inferior de lo que puede cuantificarse mediante el uso de los métodos conocidos en la técnica y los descritos en la presente descripción, por ejemplo, los ensayos descritos en el Ejemplo 7.

Este resultado implica que realizar todas las etapas en la etapa del proceso de purificación de flujo continuo, de manera continua, resulta en una pureza del producto que es comparable a cuando uno o más etapas se realizan como una operación independiente.

Además, se observa que los perfiles de presión para los dos procesos también son muy similares, como se muestra en la Figura 17.

Ejemplo 11: Efecto del tiempo de residencia sobre el desempeño de la membrana de filtración de virus

En este experimento representativo, se investiga el efecto del tiempo de residencia sobre el desempeño de la filtración de virus. Se observa que una velocidad de flujo más baja a través de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico y la etapa de filtración de virus durante la etapa del proceso de purificación de flujo continuo, resulta en una mayor capacidad de procesamiento del filtro de virus.

Un dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico de tres capas, como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 13/783,941 (ref. interna núm. MCA-1423), que tiene un área de membrana de 3,1 cm² y un volumen de membrana de 0,12 ml, se conecta en serie a un dispositivo de filtración de virus, que tiene un área de membrana de 3,1 cm². Alrededor de 3 mg/ml de una IgG humana policlonal (Seracare) en tampón de acetato de sodio 20 mM, pH 5,0, se procesa a través de los dos dispositivos conectados. El experimento se realiza a dos velocidades de flujo separadas, 100 y 200 LMH. Se coloca un filtro estéril de 0,22 µm entre el dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico y el dispositivo de filtración de virus.

Se usa un sensor de presión para medir la presión en todo el ensamblaje a diferentes velocidades de flujo. Normalmente, una presión de alrededor de 50 psi es una indicación de ensuciamiento o taponamiento de la membrana de filtración de virus. Como se muestra en la Figura 18, cuando el experimento se realiza a una velocidad de flujo más baja (es decir, 100 LMH), puede procesarse más volumen de muestra a través de la membrana de filtración de virus (es decir, mayor capacidad de procesamiento) en relación con cuando la muestra se procesa a una velocidad de flujo más alta (es decir, 200 LMH). Esto podría atribuirse a un mayor tiempo de residencia de la muestra en el dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico, lo que puede resultar en una mejora en la unión de agregados de IgG de alto peso molecular, de esta manera se evita el taponamiento temprano del filtro de virus.

Ejemplo 12. Eliminación de agregados en diversos tiempos de residencia de una alimentación de MAb mediante el uso de una resina de intercambio catiónico fuerte (CEX) modificada con un copolímero injertado AMPS/DMAM

En un frasco de vidrio de 250 ml, se añadieron 64 ml de torta húmeda de resina de cromatografía Toyopearl HW75-F. A continuación, se añadieron al frasco que contenía la resina 115 g de hidróxido de sodio 5 M, 18,75 g de sulfato de sodio y 4 ml de alil glicidil éter (AGE). Luego, el frasco se colocó en un equipo de hibridación a 50°C durante toda la noche, con rotación a velocidad media. Al día siguiente, la resina se drenó por filtración en un ensamblaje de filtro de vidrio sinterizado (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) y la torta húmeda se lavó con metanol y luego se enjuagó con agua desionizada. En un vial de vidrio, se añadieron 10 ml de torta húmeda de la resina activada por AGE. Se añadieron al vial de vidrio 0,2 g de persulfato de amonio, 0,3 g de AMPS, 1,2 g de DMAM y 48 g de agua desionizada y el vial se calentó a 60 °C durante 16 horas. Al día siguiente, la resina se drenó por filtración en un ensamblaje de filtro de vidrio sinterizado (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) y la torta húmeda se lavó con una solución de metanol y agua desionizada y la resina se etiquetó como Lote # 1712.

La resina, etiquetada como Lote # 1712, se empaquetó en una columna de cromatografía Omnifit® con un diámetro interno de 6,6 mm hasta una altura de lecho de 3 cm, lo que resultó en un lecho de resina empaquetada de alrededor de 1 ml. Se equipó un AKTA Explorer 100 (sistema de cromatografía) y se equilibró con tampones

apropiados para seleccionar estas columnas para la cromatografía de flujo continuo. Las columnas de cromatografía que contenían la muestra de resina se cargaron en el sistema de cromatografía con tampón de equilibrio. La carga de alimentación era una carga de alimentación de IgG1 (MAB5) que se purificó mediante el uso de medios de cromatografía de afinidad ProSep® Ultra Plus y se ajustó a pH 5,0 con base Tris 2 M. La concentración final de la mezcla de muestras de Proteína A se diluyó a 4 mg/ml, contenía un 5,5 % de producto agregado y una conductividad de alrededor de 3,2 mS/cm. La resina se cargó con un tiempo de residencia de 1, 3 o 6 minutos y con una densidad de carga de 144 mg/ml. La fracción del pico de la franja para el tiempo de residencia de 3 minutos contenía 95,6 % de agregados, lo que indica un alto nivel de selectividad para las especies agregadas. Los resultados se representan en la Tabla VI que aparece más abajo.

La Tabla VI representa la retención de monómero y agregados para el Lote # 1712 con el MAB5 a pH 5,0 con un tiempo de residencia de 6, 3 o 1 minuto. Como se muestra en la Tabla VI, en promedio, las especies monoméricas pueden recolectarse en concentraciones cercanas a la concentración en el alimento, relativamente temprano en comparación con las especies agregadas para todos los tiempos de residencia probados, lo que sugiere que la selectividad es relativamente insensible a las velocidades de flujo.

Tabla VI

Recolección de flujo continuo	Densidad de carga de proteína acumulada	Promedio del tiempo de residencia de 6, 3 o 1 minuto	Tiempo de residencia de 6 minutos	Tiempo de residencia de 3 minutos	Tiempo de residencia de 1 minuto
Fracción #	(mg/ml)	% de proteína en flujo continuo	% de agregados	% de agregados	% de agregados
1	16	13,5	0,0 %	0,0 %	0,0 %
2	32	94,3	0,0 %	0,0 %	0,0 %
3	48	94,4	0,0 %	0,0 %	0,0 %
4	64	95,2	0,0 %	0,0 %	0,0 %
5	80	98,3	0,5 %	0,0 %	0,0 %
6	96	100,0	0,7 %	0,3 %	0,0 %
7	112	99,3	1,1 %	0,9 %	2,1 %
8	128	100,0	2,3 %	1,6 %	2,8 %
9	144	100,0	3,1 %	3,6 %	4,8 %

Como se representa en la Figura 19, la mayor parte del producto se recolecta en el flujo continuo y esto se indica por el avance, relativamente rápido, de la traza UV de proteína. El tamaño del pico de la franja generalmente varía en base a las condiciones y la masa total cargada, pero está relativamente enriquecido con especies de agregados en un 95,6 %, en comparación con el material de carga que tenía solo un 5,5 % de agregados.

Ejemplo 13: Eliminación de agregados de una alimentación de MAB mediante el uso de fibras aladas de intercambio catiónico (CEX) modificadas con un copolímero injertado AMPS/DMAM.

En este experimento representativo, se usaron fibras aladas de intercambio catiónico como soporte sólido.

En un frasco de vidrio de 1 l, se combinaron 20 g de fibras multilobuladas o aladas de nailon secas con 400 g de hidróxido de sodio 4 M, 24 g de sulfato de sodio y 160 ml de alil glicidil éter (AGE). Luego, el frasco se colocó en un equipo de hibridación a 50 °C durante la toda noche con rotación a velocidad media. Al día siguiente, las fibras se filtraron en un filtro de vidrio sinterizado y luego se lavaron con metanol y se enjuagaron con agua Milli-Q. Un día después, las fibras se lavaron con agua, seguida de metanol y luego con agua nuevamente, se succionaron hasta obtener una torta seca y se secaron en un horno de vacío a 50 °C durante 1 día. La muestra resultante se etiquetó como Muestra #1635. En tres viales de vidrio separados, se pesaron 2 gramos de torta seca de la Muestra # 1635, fibras activadas por AGE, y se añadieron a un vial de vidrio para una modificación adicional mediante injerto. Al vial de vidrio, se añadieron persulfato de amonio, AMPS, DMAM y agua desionizada en las cantidades especificadas en la Tabla VII y el vial se calentó a 60 °C durante 16 horas con rotación continua. Al día siguiente, las muestras de fibra se filtraron en un filtro de vidrio sinterizado y la torta húmeda se lavó con una solución de agua desionizada. Los viales que contenían las fibras se etiquetaron como Lote # 1635-1, 1635-2 y 1635-5. A continuación, se tituló el Lote #1635-5 para determinar la capacidad de iones pequeños, que se encontró que era de alrededor de 28 µmol/ml. Luego se asumió que las muestras #1635-1 y #1635-2 también tenían una capacidad de iones pequeños menor que 28 µmol/ml.

Tabla VII

Ingredientes	#1635-1	#1635-2	#1635-5
Fibras (g)	2,0	2,0	2,0
Persulfato de amonio (g)	0,18	0,18	0,18
AMPS (g)	0,48	0,60	0,72
DMAM (g)	0,48	0,60	0,72
Agua (g)	28,86	28,62	28,38

Las fibras aladas modificadas resultantes, Lote # 1635-1, #1635-2, #1635-5 se empaquetaron en una columna de cromatografía Omnifit[®] con un diámetro interno de 6,6 mm hasta una altura de lecho de 3 cm, lo que resultó en alrededor de 1 ml de lecho de fibra empaquetada. Se equipó un AKTA Explorer 100 (sistema de cromatografía) y se equilibró con tampones apropiados para seleccionar estas columnas para la cromatografía de flujo continuo. Las columnas de cromatografía que contenían las muestras de fibra alada se cargaron en el sistema de cromatografía con tampón de equilibrio. La carga de alimentación era una carga de alimentación de IgG1 (MAb5) que se purificó mediante cromatografía de afinidad de Proteína A y se ajustó a pH 5,0 con base Tris 2 M. La concentración final de la mezcla de muestras de Proteína A fue de 4 mg/ml y contenía un 5,5 % de producto agregado o de HMW. Esta es la misma carga de alimentación que se usó en el Ejemplo 12. Las columnas empaquetadas con fibra del Lote # 1635-1 y Lote # 1635-2 se cargaron con una carga de masa de 64 mg/ml y la columna empaquetada con fibra del Lote 1635-5 se cargó con una carga de masa de 80 mg/ml. Los resultados se representan en la Tabla VIII que aparece más abajo.

Carga de proteína acumulada	Fibra Lote #1635-1			Fibra Lote #1635-2			Fibra Lote #1635-5		
	Monómero (%)	Dímeros (%)	LMW (%)	Monómero (%)	Dímeros (%)	LMW (%)	Monómero (%)	Dímeros (%)	LMW (%)

mg/ml									
8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16	85,8	0,0	14,0	86,0	0,0	15,6	1,7	0,0	10,2
24	84,3	0,0	15,6	85,6	0,0	14,8	51,8	0,0	13,4
32	83,2	0,6	16,0	83,0	0,0	17,1	85,6	0,0	15,1
40	79,4	2,4	17,7	81,1	0,0	14,9	86,5	0,0	13,9
48	79,6	4,4	15,8	82,5	1,5	15,9	83,3	0,0	15,8
56	82,4	4,4	12,8	79,4	2,1	18,3	87,1	0,0	13,1
64	81,1	4,5	14,2	83,1	3,1	14,7	85,4	2,3	13,6
72	N/A*	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	85,7	4,0	13,6
80	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	85,1	5,1	13,8
pico de la franja	38,0	63,5	0,0	54,4	35,0	11,0	51,3	43,0	5,6

Tabla VIII

*N/A = No aplicable

Ejemplo 14: El efecto combinado de la clarificación del polímero sensible al estímulo y la adición de NaCl al cultivo celular clarificado sobre la pureza de la mezcla de muestras de elución de Proteína A

En este experimento representativo, un fluido de cultivo celular MAb04 se clarifica mediante el uso de una filtración en profundidad o una etapa de precipitación, mediante el uso de, específicamente, un polímero sensible al estímulo (es decir, polialilamina modificada). Las soluciones clarificadas resultantes se cargan en una columna que contiene resina ProSep[®] Ultra Plus o tienen NaCl añadido, hasta una concentración final de NaCl 0,5 M antes de cargarlas en la columna. En ausencia de la adición de NaCl, la columna se equilibra con TBS 1X antes de la carga, mientras que, con NaCl, el tampón de equilibrio es TBS 1X, NaCl 0,5 M. Todas las columnas se cargan con aproximadamente 30 g de MAb04 por litro de resina y luego se lavan con tampón de equilibrio con 2 VC, seguido de un lavado con 3 VC de

Tris 25 mM pH 7,0. El MAb04 unido se eluye con la solución de glicina HCl 25 mM, ácido acético 25 mM, pH 2,5 y luego se limpia con 5 VC de ácido fosfórico 0,15 M, pH 1,6, antes del reequilibrio con el tampón de equilibrio apropiado.

5 La Figura 20 muestra una superposición de los picos de elución y limpieza, donde el pico de elución generado a partir del cultivo celular tratado con el polímero sensible al estímulo muestra una cola más nítida y un pico de limpieza reducido. En presencia de NaCl, durante la carga con el cultivo celular tratado con el polímero sensible al estímulo, el pico de limpieza se reduce adicionalmente, lo que indica, de esta manera, un nivel más bajo de impurezas fuertemente unidas en la resina.

10 Ejemplo 15: Comparación del efecto de diferentes concentraciones de NaCl durante las etapas de lavado intermedio con el efecto del NaCl 0,5 M presente en la solución de carga

15 En este experimento representativo, se compara directamente el impacto de diferentes concentraciones de NaCl durante las etapas de lavado intermedio, sobre la pureza de la mezcla de muestras de elución de anticuerpos monoclonales (MAb), lograda mediante la cromatografía de Proteína A, con el impacto de tener NaCl 0,5 M en la muestra que se carga en una columna de cromatografía de Proteína A.

20 Se adquiere una columna de 5 ml de medio ProSep® Ultra Plus Protein A como columna empaquetada previamente. Todas las ejecuciones de cromatografía se realizan mediante el uso de un sistema de cromatografía Äkta Explorer con una velocidad de flujo de 1,7 ml/min (~ 3 minutos de tiempo de residencia) para todas las etapas. Se usa la misma columna para todos los experimentos. Para el primer conjunto de experimentos, donde el NaCl está presente en el lavado intermedio, la etapa de cromatografía empleó un equilibrio de 5 volúmenes de columna con TBS 1X seguido de la carga de 300 ml de cultivo celular clarificado que contenía una proteína diana (denominada MAb05) en una concentración de aproximadamente 0,57 g/l. Después de cargar el cultivo celular, la columna se enjuaga con 10 ml de tampón de equilibrio para eliminar cualquier producto que no se una, impurezas y otros componentes del cultivo celular. Luego, la columna se lava con 5 volúmenes de columna de Tris 25 mM, pH 7,0 que también incluye NaCl 0,5 M. Posteriormente, la columna se lava con 5 volúmenes de columna de Tris 25 mM, pH 7,0 sin NaCl. La proteína del producto (MAb05) se eluye de la columna en 5 volúmenes de columna mediante el uso de un tampón que contiene ácido acético 25 mM y glicina HCl 25 mM a pH 2,5. Posteriormente, la columna se limpia con 5 volúmenes de columna de ácido fosfórico 0,15 M seguido de una etapa de regeneración de 10 volúmenes de columna mediante el uso del tampón de equilibrio. Se realizan ejecuciones equivalentes donde la concentración de NaCl durante el primer lavado varía entre 0, 1,5 y 2 M.

35 El siguiente experimento se realiza mediante el uso de la misma columna con los siguientes cambios en el protocolo. La muestra de cultivo celular que se carga se mezcla con un volumen de NaCl 5 M, de modo que la concentración final de NaCl en el cultivo celular clarificado sea NaCl 0,5 M. El tampón de equilibrio se modifica para incluir NaCl 0,5 M en la solución de TBS 1X. La columna se carga con 333 ml de cultivo celular clarificado con NaCl 0,5 M presente para mantener una carga de masa constante de la proteína diana (MAb05). El lavado intermedio se realiza como se describió previamente, donde se usa un total de 10 volúmenes de columna de Tris 25 mM, pH 7,0. Las etapas de elución y limpieza y los tampones permanecen idénticos a los descritos anteriormente. La Tabla IX proporciona un resumen abreviado de las etapas realizadas para cada experimento, donde se identifican los tampones y volúmenes usados para cada etapa donde se hace un posible cambio.

45 Tabla IX

Número de muestra	Tampón de equilibrio (25 ml)	Volumen de carga	Tampón de lavado intermedio 1 (25 ml)	Tampón de lavado intermedio 2 (25 ml)
50 1	TBS 1X	300 ml	Tris 25 mM, pH 7	Tris 25 mM, pH 7
2	TBS 1X	300 ml	Tris 25 mM, NaCl 0,5 M, pH 7	Tris 25 mM, pH 7
3	TBS 1X	300 ml	Tris 25 mM, NaCl 1,5 M, pH 7	Tris 25 mM, pH 7
55 4	TBS 1X	300 ml	Tris 25 mM, NaCl 2 M, pH 7	Tris 25 mM, pH 7
5	TBS 1X, NaCl 0,5 M	333 ml	Tris 25 mM, pH 7	Tris 25 mM, pH 7

60 Las muestras de los cultivos de carga y las mezclas de muestras de elución se miden para determinar la concentración de MAb05 y la concentración de HCP. La Figura 21 muestra el LRV de HCP en función de la concentración de NaCl usada en el lavado intermedio o usada en la etapa de carga. La figura ilustra la mejora en el nivel de eliminación (purificación) de HCP cuando está presente el NaCl 0,5 M en el tampón de equilibrio y el cultivo celular clarificado durante la fase de carga en comparación con la adición de NaCl a las etapas de lavado intermedio, en concentraciones variables. Los resultados también proporcionan las concentraciones de HCP medidas en partes por millón (ppm) en base a los ng de HCP por mg de MAb05, que se muestran como números dentro de la barra correspondiente. Además, la Figura 22 muestra el % de MAb05 recuperado en la mezcla de

65

muestras de elución en comparación con la masa cargada, donde se observa claramente que con el NaCl 2 M presente durante la etapa de lavado intermedio, se produce una pérdida significativa de producto.

Ejemplo 16: Comparación de la purificación del producto lograda en base a la etapa de purificación de Proteína A durante la que se incluye un aditivo

En este experimento representativo, se hace una comparación directa entre la purificación lograda mediante la cromatografía de Proteína A con un aditivo presente en el lavado intermedio solo con la purificación lograda con un aditivo en el tampón de equilibrio y las muestras de cultivo celular que se cargan.

Se adquiere una columna de 5 ml de medio ProSep® Ultra Plus Protein A como columna empaquetada previamente. Todas las ejecuciones de cromatografía se realizan mediante el uso de un sistema de cromatografía Äkta Avant con una velocidad de flujo de 1,7 ml/min (~ 3 minutos de tiempo de residencia) para todas las etapas. Se usa la misma columna para todos los experimentos. Para todos los experimentos de lavado, se aplica el método descrito en el Ejemplo 15 anterior donde se reemplaza el NaCl con un aditivo específico a una concentración definida. Los aditivos y concentraciones utilizados se proporcionan en la Tabla X.

Tabla X

Identidad del aditivo	Concentración de reserva	Concentración de trabajo final	Conductividad medida de las soluciones (mS/cm)		
			TBS + aditivo (16,07 - TBS solo)	Tampón de lavado (Tris 25 mM + aditivo - 1,2 - tampón Tris solo)	Cultivo celular MAb05 + aditivo (0,016 - cultivo celular solo)
NaCl	5M	0,5 M	53,4	50,0	31,9
Urea	8M	0,5 M	13,4	1,96	8,29
Sulfato de amonio	3M	0,5 M	78,0	69,2	47,6
Tween-20	100 %	0,5 %	14,0	1,97	15,6
Pluronic F-68	10 %	0,5 %	13,3	1,89	15,4
PEG 400	100 %	10 %	9,89	1,44	4,66
PEG 8000	30 %	5 %	10,9	1,53	10,9
TMAC	5M	0,5 M	48,1	37,9	47,1
Hexilenglicol	100 %	5 %	12,0	1,69	5,84

La Figura 23 muestra la concentración de HCP que permanece en la mezcla de muestras de elución del producto para cada aditivo usado, ya sea que esté presente en la primera etapa de lavado intermedio o en el tampón de equilibrio y la muestra de cultivo celular. La adición de diferentes sales (NaCl, Sulfato de Amonio o TMAC) muestra los niveles más bajos de HCP, cuando las sales están presentes en la fase de carga.

La Figura 24 muestra el LRV de HCP (en relación con la concentración de HCP de carga) en función del aditivo usado y la etapa de purificación durante la que se usa el aditivo. Esta figura ilustra, nuevamente, que las sales son más efectivas para reducir las concentraciones de HCP, es decir, aumentar el LRV de HCP. Como se demostró, la presencia del aditivo en las soluciones de carga muestra una mejora en la eliminación de impurezas en comparación con el mismo aditivo presente solo en el lavado intermedio. Las Tablas XI y XII resumen los resultados numéricos ilustrados en las Figuras 23 y 24, la Tabla XI muestra los datos cuando el aditivo está presente en la etapa de carga y la Tabla XII muestra los datos cuando el aditivo está presente solo durante el lavado intermedio.

Tabla XI

Aditivo	[MAb05] en la mezcla de muestras de elución (g/L)	% de recuperación de MAb05	[HCP] en la carga de cultivo celular (ppm)	[HCP] en la mezcla de muestras de elución (ppm)	LRV de HCP
Ninguno	13,26	93,1	220350	1226	2,25
NaCl	13,49	92,0	217850	106,8	3,31
Sulfato de amonio	13,64	94,9	279871	124,6	3,35
TMAC	15,44	99,9	218200	49,5	3,64
Urea	12,83	95,6	166382	3133	1,73
Tween-20	13,01	94,2	222464	2371	1,97
Pluronic F-68	13,28	87,5	232195	2140	2,04
PEG 400	14,15	76,2	341212	252,0	3,13
PEG 8000	14,18	173,8	374388	4475	1,92
Hexilenglicol	13,73	99,9	230147	2053	2,05

Tabla XII

Aditivo	[MAb05] en la mezcla de muestras de elución (g/L)	% de recuperación de MAb05	[HCP] en la carga de cultivo celular (ppm)	[HCP] en la mezcla de muestras de elución (ppm)	LRV de HCP
Ninguno	13,26	93,1	220350	1226	2,25
NaCl	13,04	103,9	232274	350,0	2,82
Sulfato de amonio	13,11	98,5	208246	279,8	2,87
TMAC	15,20	83,9	241755	85,28	3,45
Urea	12,93	90,1	189352	3211	1,77
Tween-20	12,79	91,7	227974	3032	1,88
Pluronic F-68	13,76	103,5	243325	2034	2,08
PEG 400	14,47	112,4	236376	915,0	2,41
PEG 8000	14,40	101,9	251847	2204	2,06
Hexilenglicol	14,00	75,3	244069	1738	2,15

La Figura 25 ilustra un ejemplo del volumen relativo de la mezcla de muestras de elución en dependencia de la identidad del aditivo y la etapa de cromatografía durante la que se incluye el aditivo. La figura muestra que cuando la relación entre el volumen de la mezcla de muestras de elución del aditivo y el volumen de la mezcla de muestras de elución del control (es decir, donde no hay aditivos presentes) es superior al 100 %, el volumen de la mezcla de muestras de elución del aditivo supera el volumen de elución del control. Por el contrario, los valores menores que 100 % indican una disminución en el volumen de la mezcla de muestras de elución del aditivo en relación con el volumen de la mezcla de muestras de elución del control. Esta figura demuestra además el impacto de los aditivos en el volumen de la mezcla de muestras de elución. Se prefiere un valor menor que 100 %. Al combinar la información provista en las Figuras 23, 24 y 25 con los datos numéricos en las Tablas XI y XII, el orden de las condiciones de mejor desempeño es TMAC en la carga > TMAC en el lavado > Sulfato de amonio en la carga > NaCl en la carga > Sulfato de amonio en el lavado. El orden proporcionado aquí se basa en que el LRV de HCP es de importancia primordial seguido de la recuperación del producto. Si la concentración de HCP en ppm es de importancia primordial, el orden cambia ligeramente a TMAC en la carga > TMAC en el lavado > NaCl en la carga > Sulfato de amonio en la carga > Sulfato de amonio en el lavado.

A menos que se indique de cualquier otra manera, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivos celulares, condiciones de tratamiento y así sucesivamente, usados en la descripción, incluidas las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "alrededor de". En consecuencia, a menos que se indique de cualquier otra manera, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar en dependencia de las propiedades deseadas que se pretenden obtener mediante la presente invención. A menos que se indique de cualquier otra manera, el término "al menos" que precede a una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada elemento de la serie.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Un proceso de flujo continuo para purificar una molécula diana a partir de un eluido de Proteína A que comprende las etapas de:
- 10
- a) poner en contacto el eluido recuperado de una columna de cromatografía de Proteína A con carbón activado;
 - b) poner en contacto la muestra de flujo continuo de la etapa (a) con un medio de cromatografía de intercambio aniónico; y
 - 15 c) poner en contacto la muestra de flujo continuo de la etapa (b) con un medio de cromatografía de intercambio catiónico; y
 - d) obtener la muestra de flujo continuo de la etapa (c) que comprende la molécula diana,
- 20
- en donde el eluido fluye continuamente a través de las etapas (a)-(c) y en donde el nivel de una o más impurezas en la muestra de flujo continuo en (d) es más bajo que el nivel en el eluido en la etapa (a).
2. El proceso de flujo continuo de la reivindicación 1, que comprende además someter la muestra de flujo continuo de la etapa (c) a la filtración de virus.
- 25
3. El proceso de flujo continuo de la reivindicación 1, que comprende además el uso de un mezclador estático en línea y/o un tanque de compensación entre las etapas (b) y (c) para cambiar el pH.
4. El proceso de flujo continuo de la reivindicación 1, en donde el eluido de la columna de cromatografía de Proteína A se somete a la inactivación de virus antes de ponerse en contacto con el carbón activado.
5. El proceso de flujo continuo de la reivindicación 1, en donde las etapas (a)-(c) pueden realizarse en cualquier orden.
- 30
6. El proceso de flujo continuo de la reivindicación 1, en donde el proceso emplea un único patín.

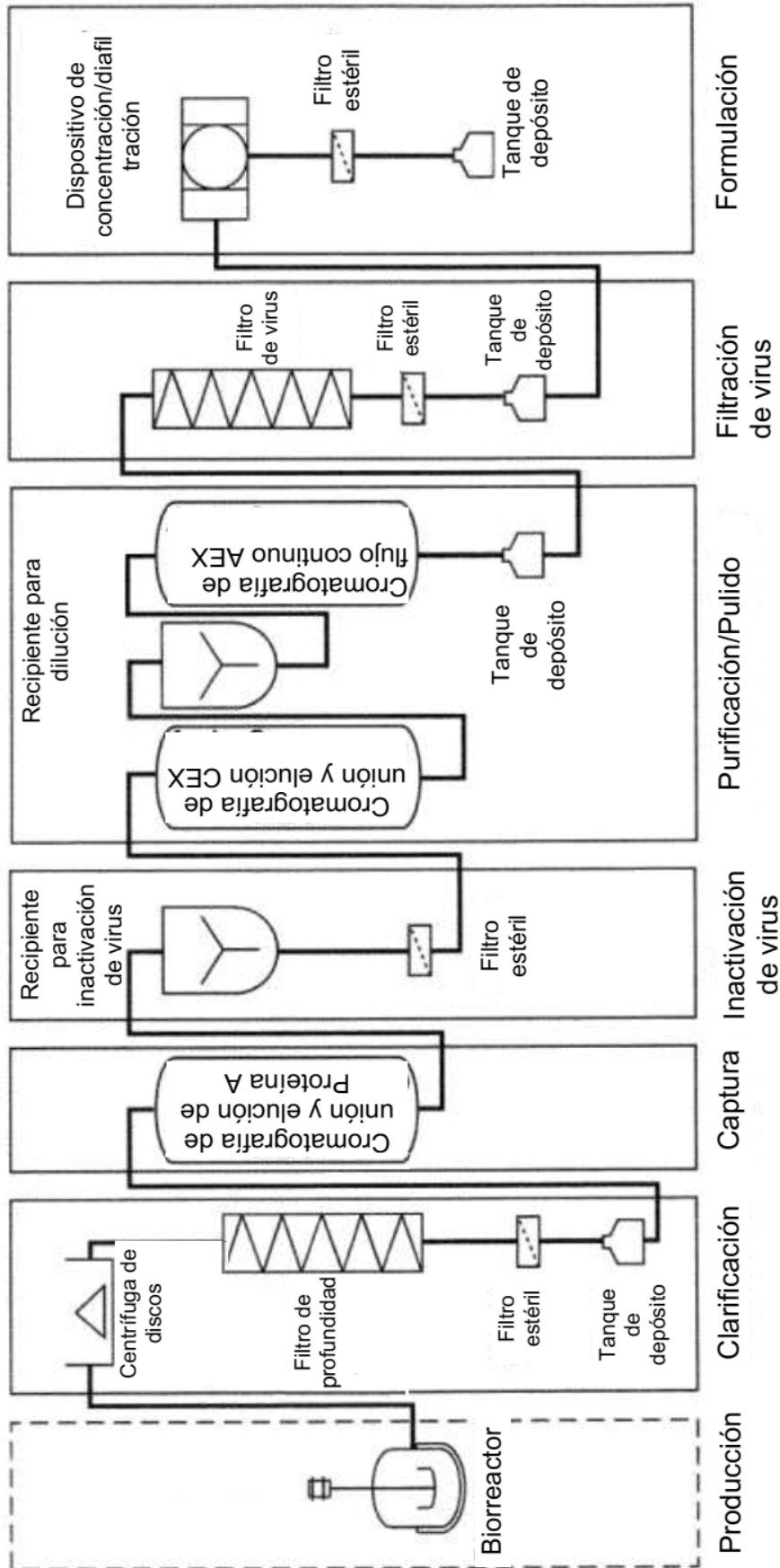


Figura 1

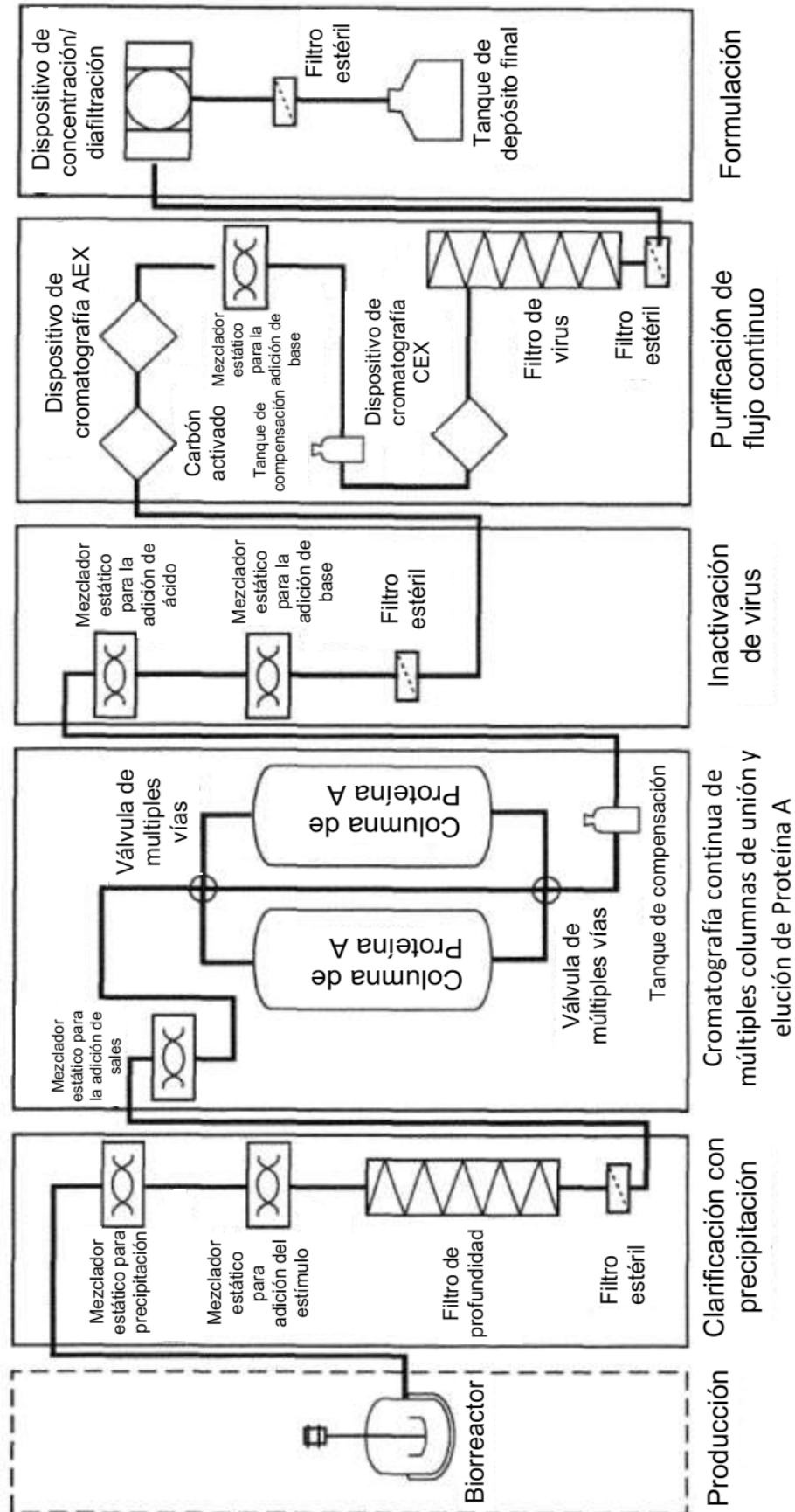


Figura 2

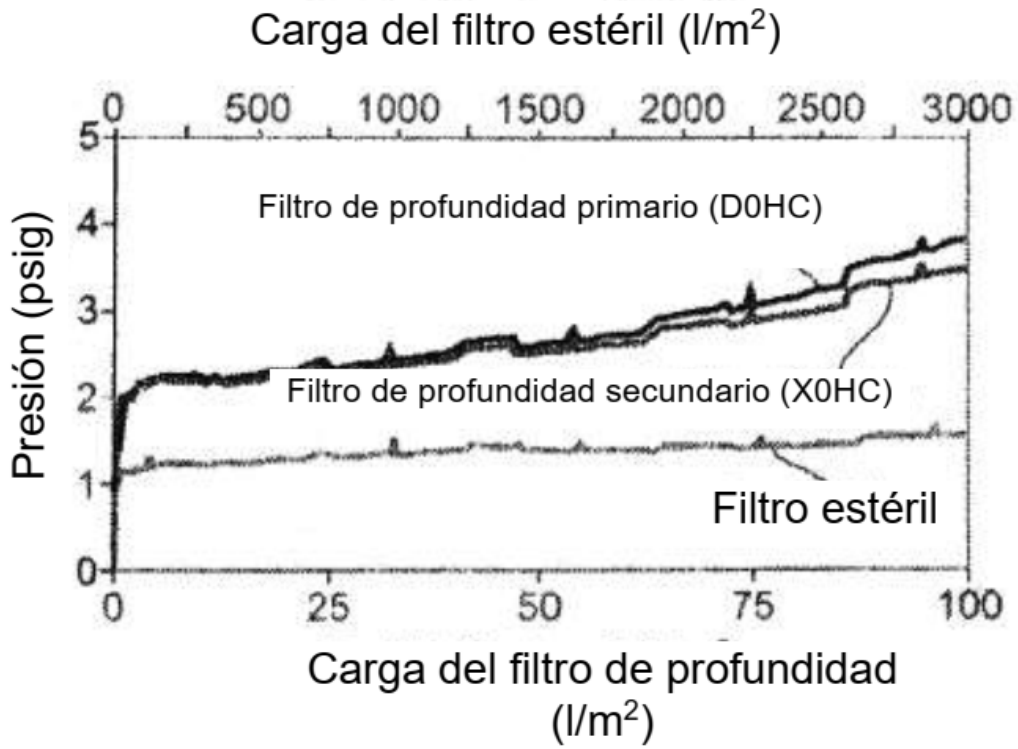


Figura 3

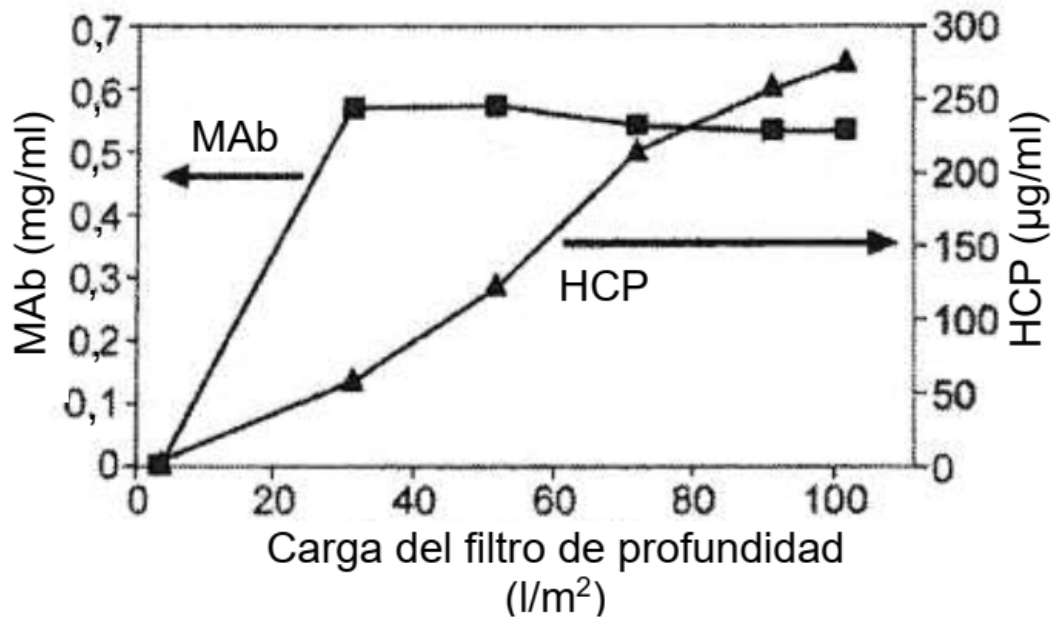


Figura 4

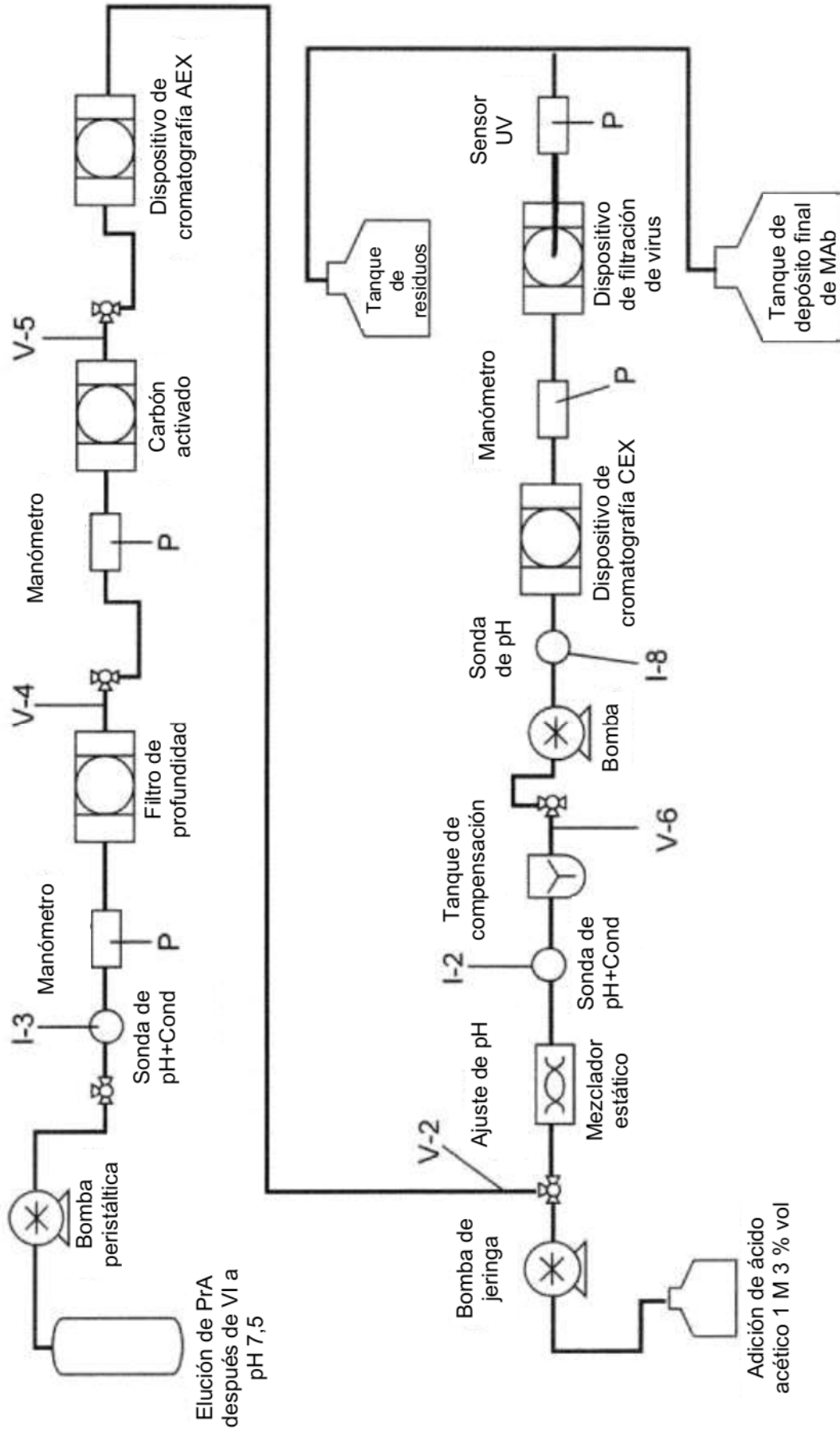


Figura 5

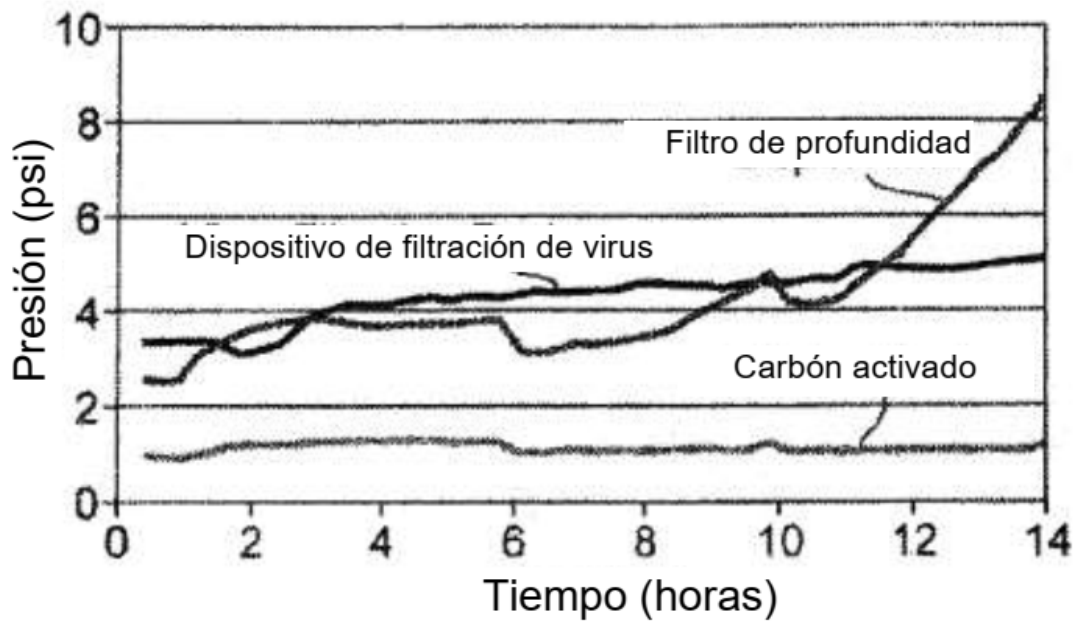


Figura 6

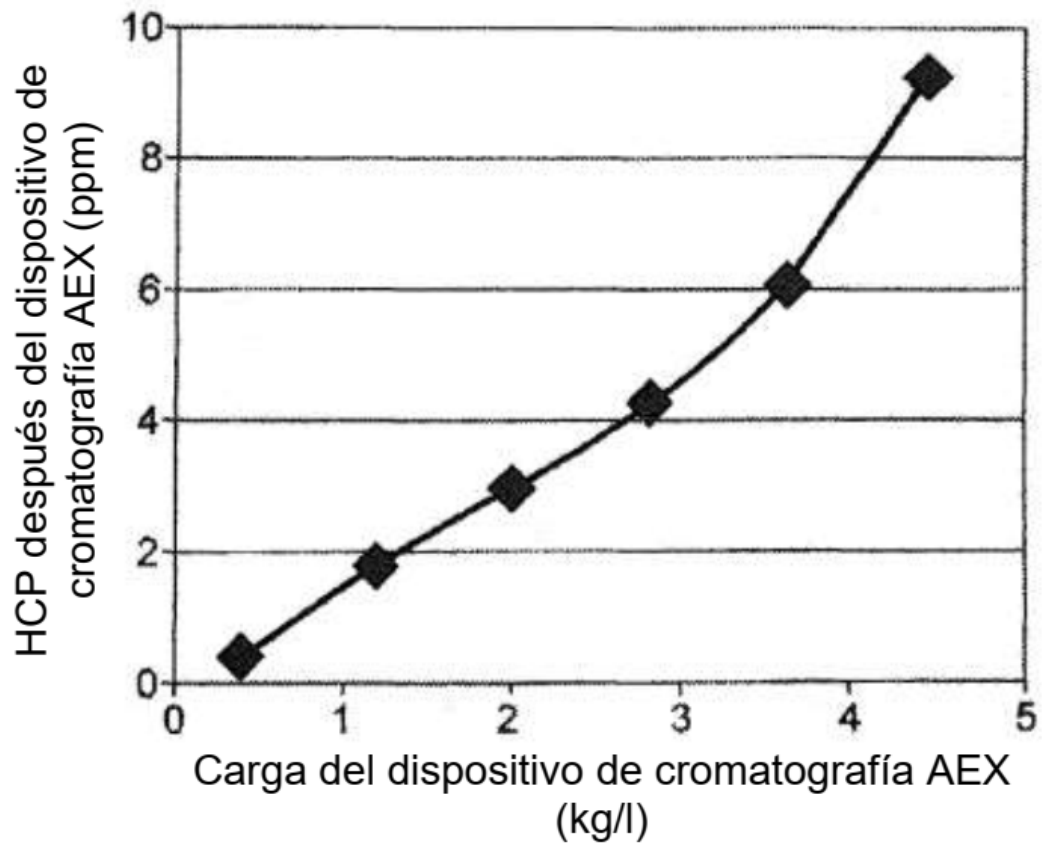


Figura 7

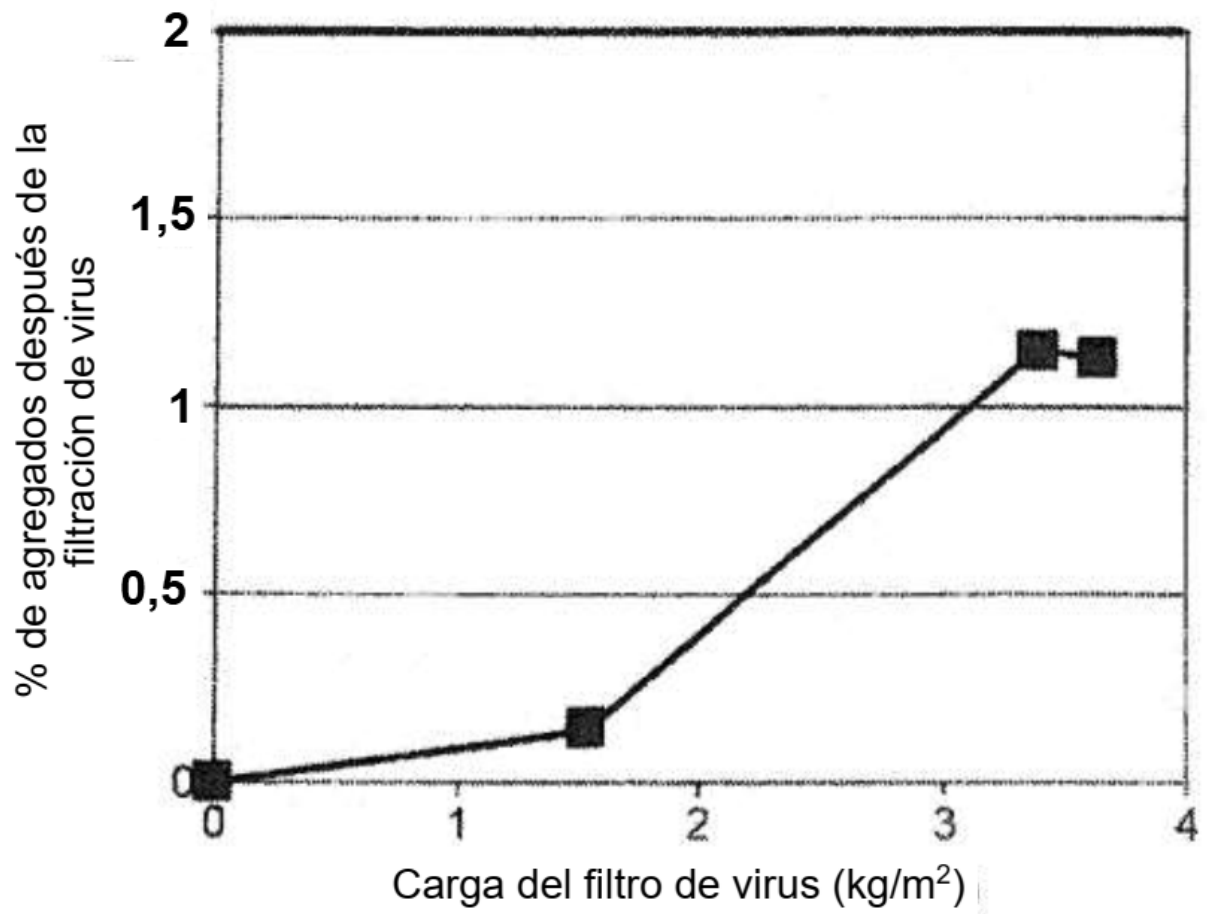


Figura 8

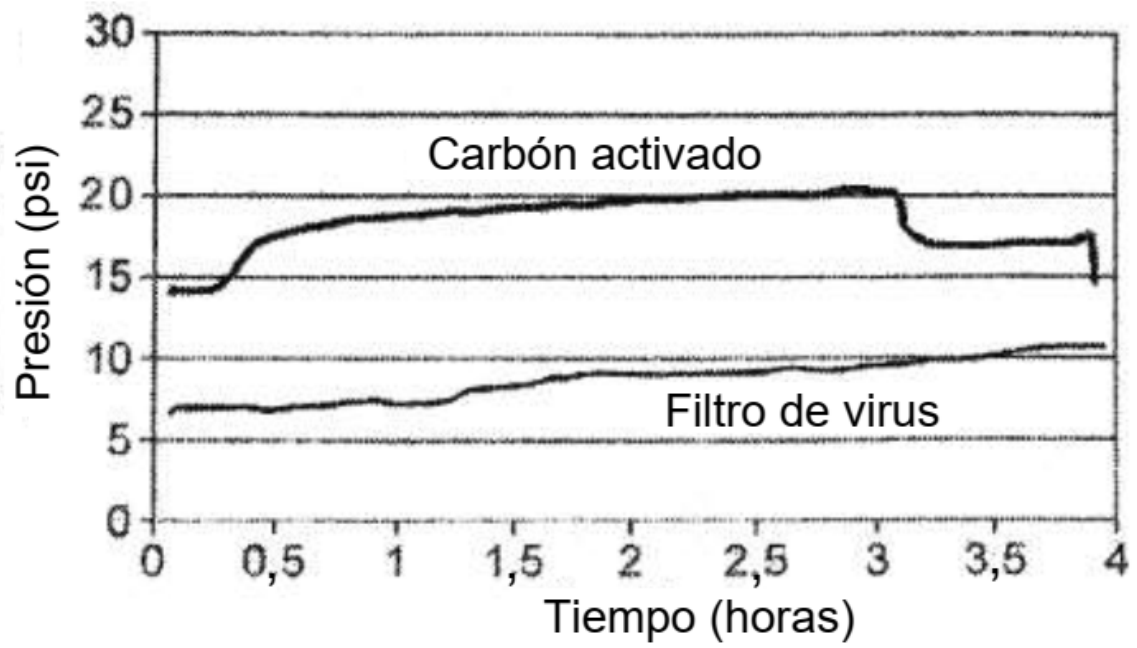


Figura 9

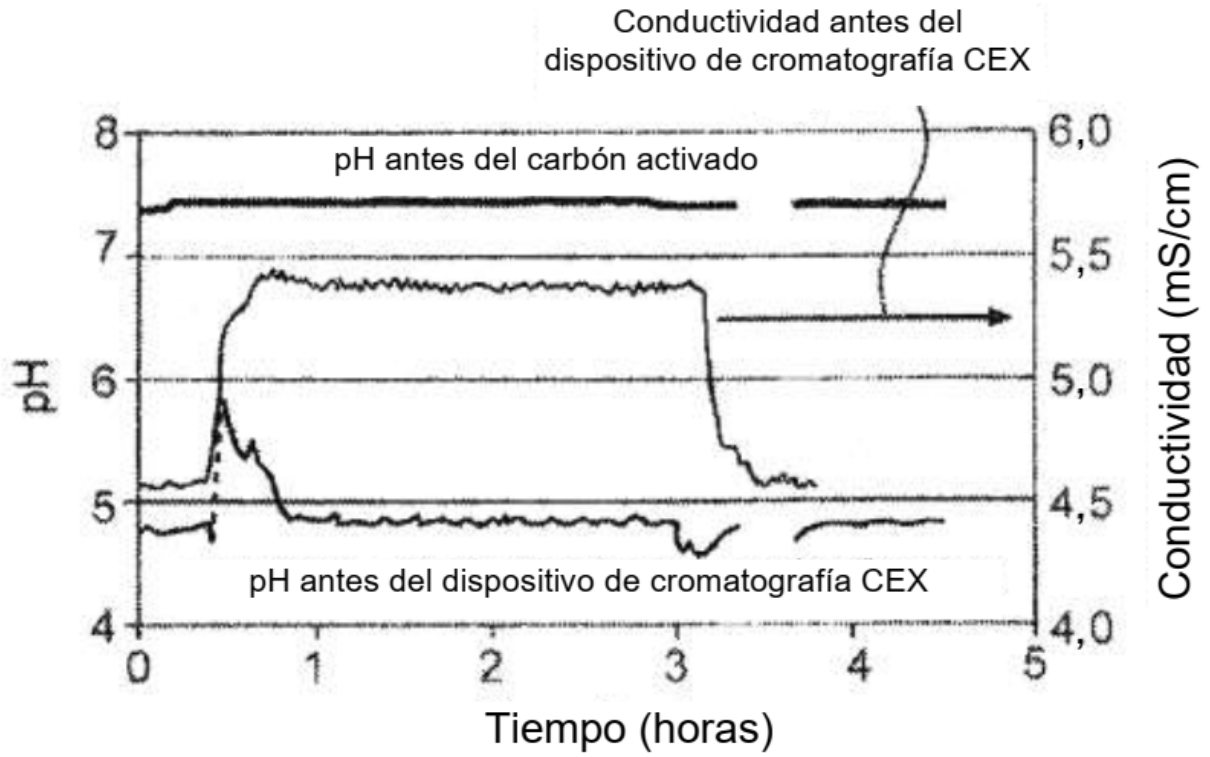
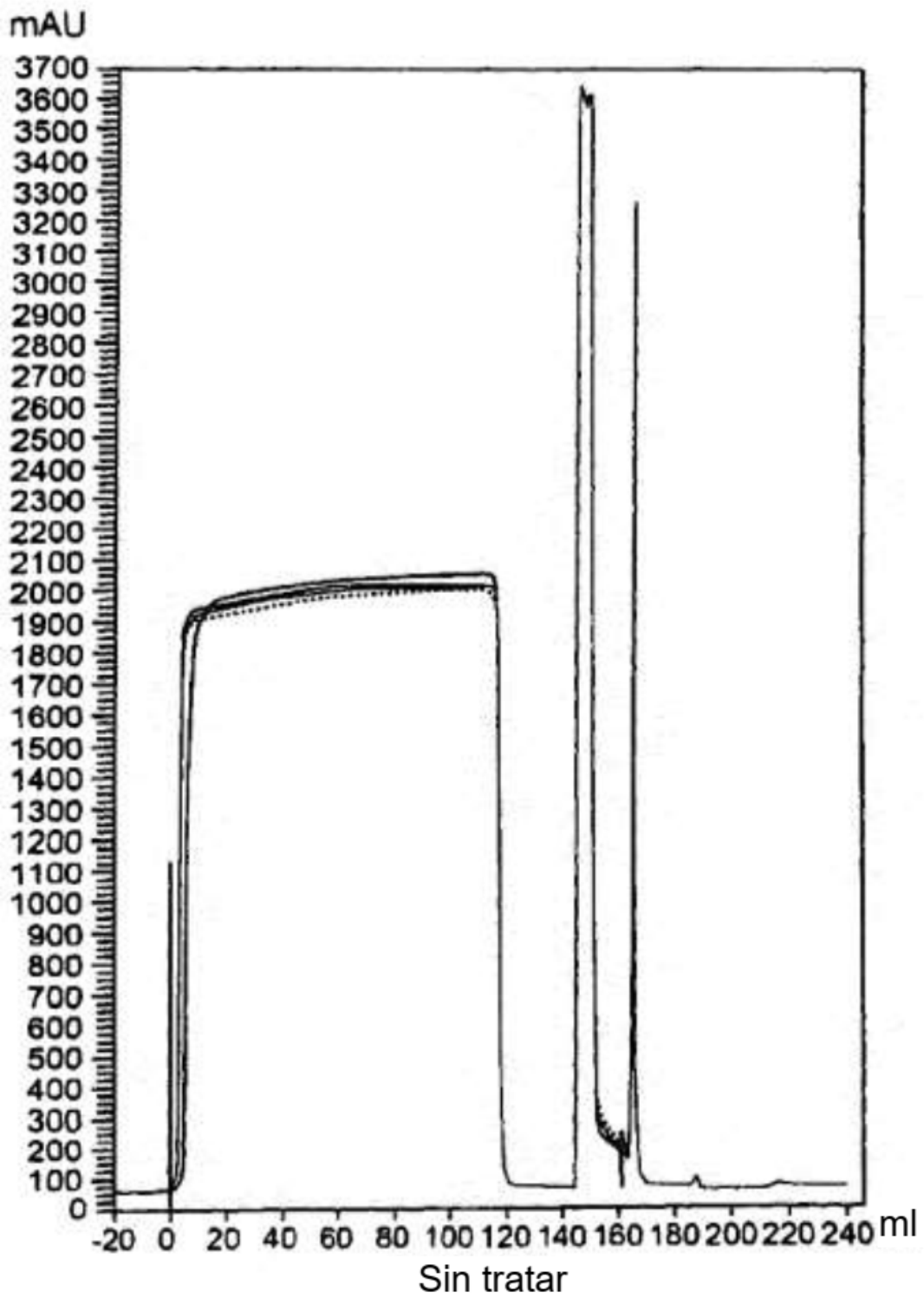


Figura 10



Sin tratar
Figura 11

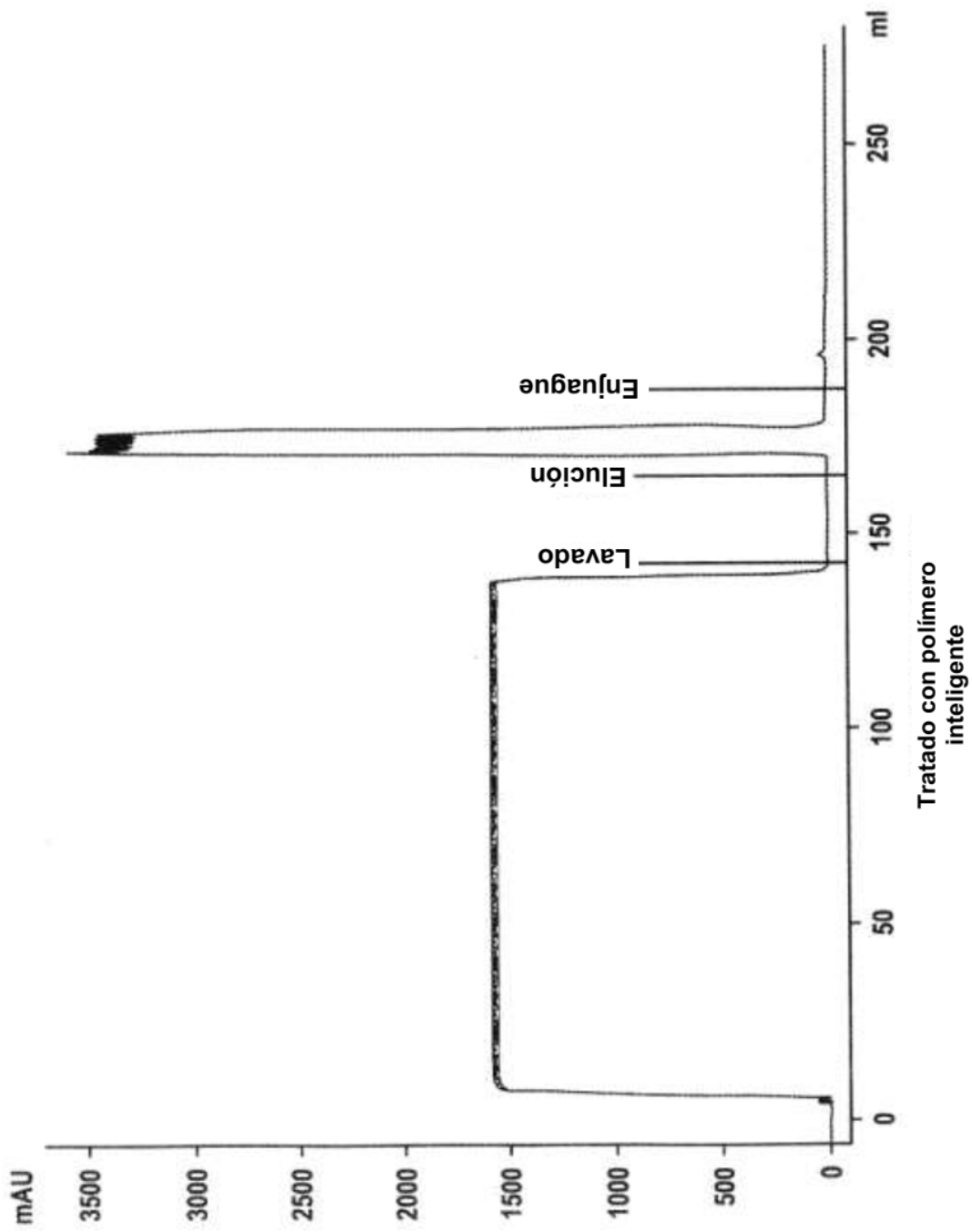


Figura 12

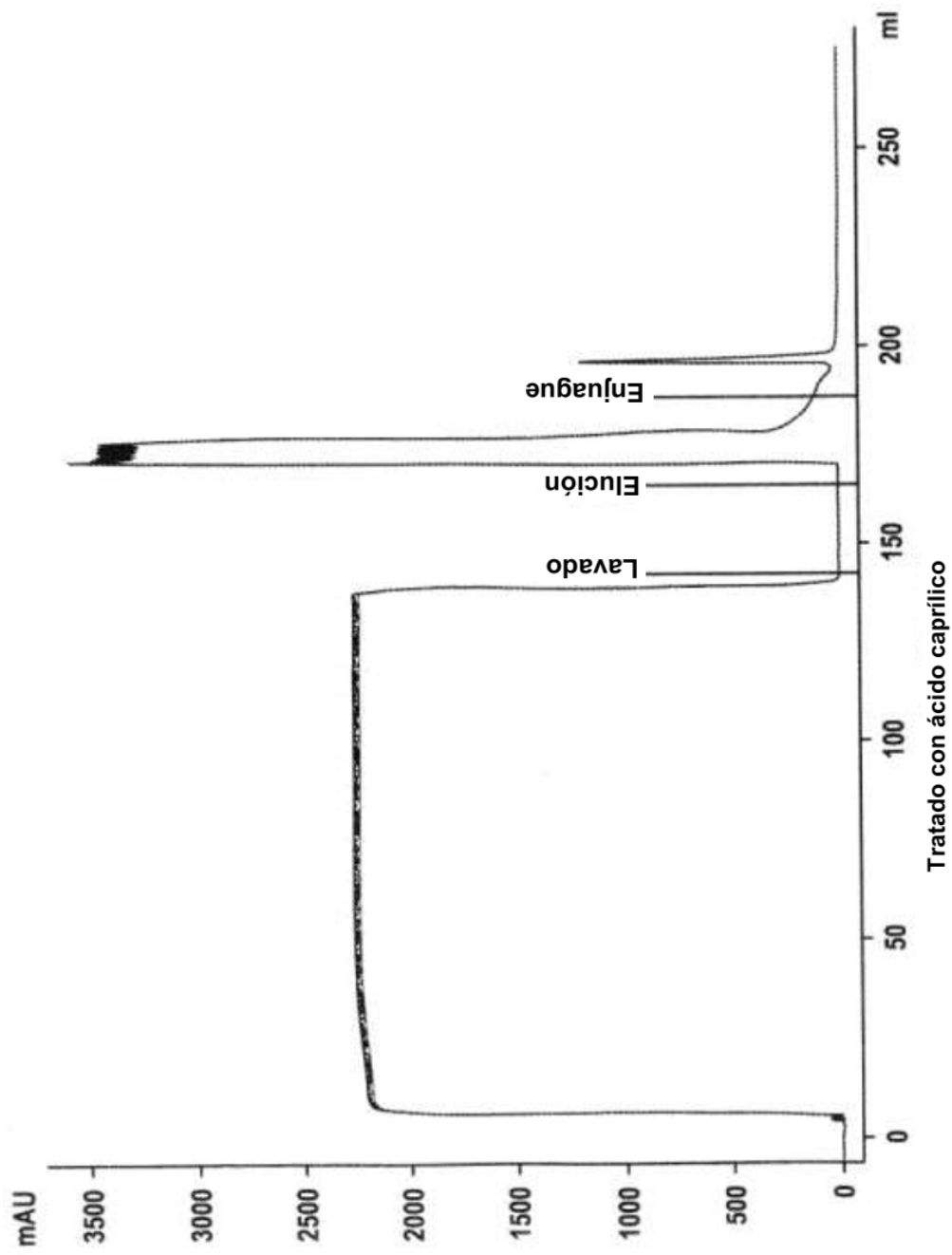


Figura 13

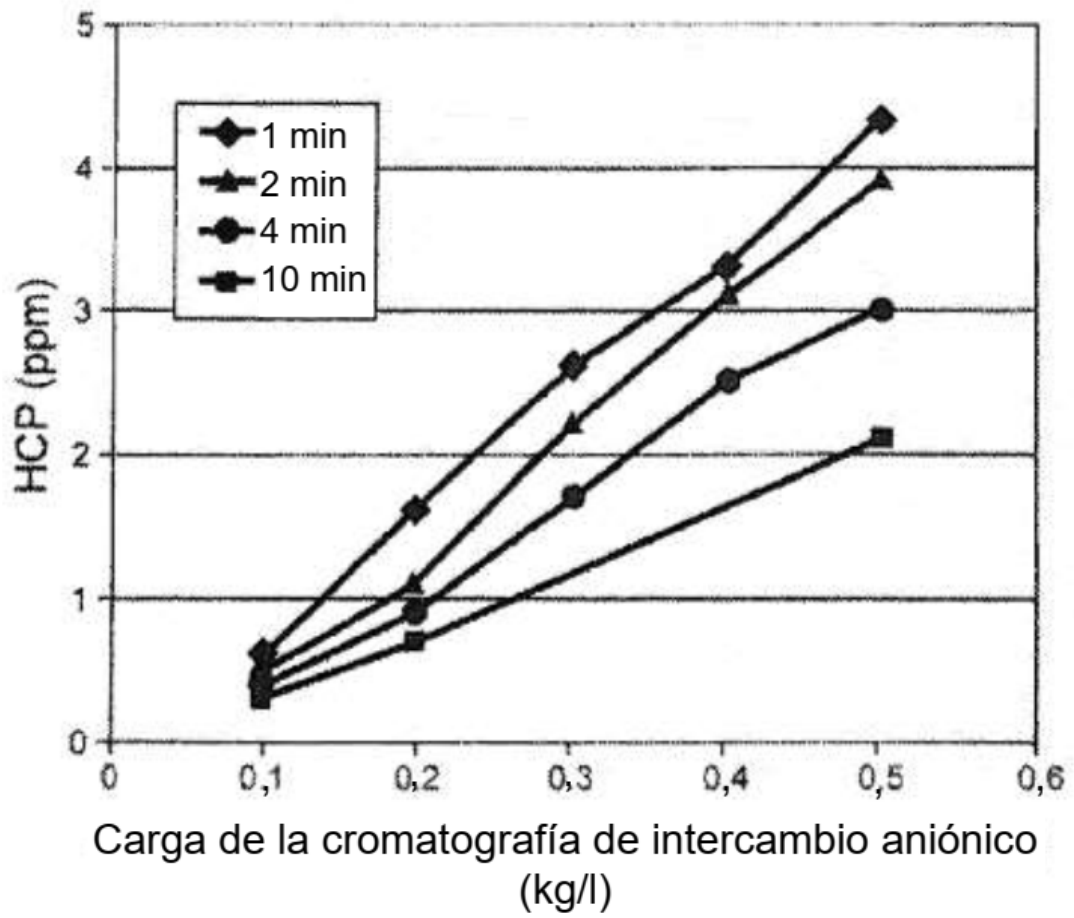


Figura 14

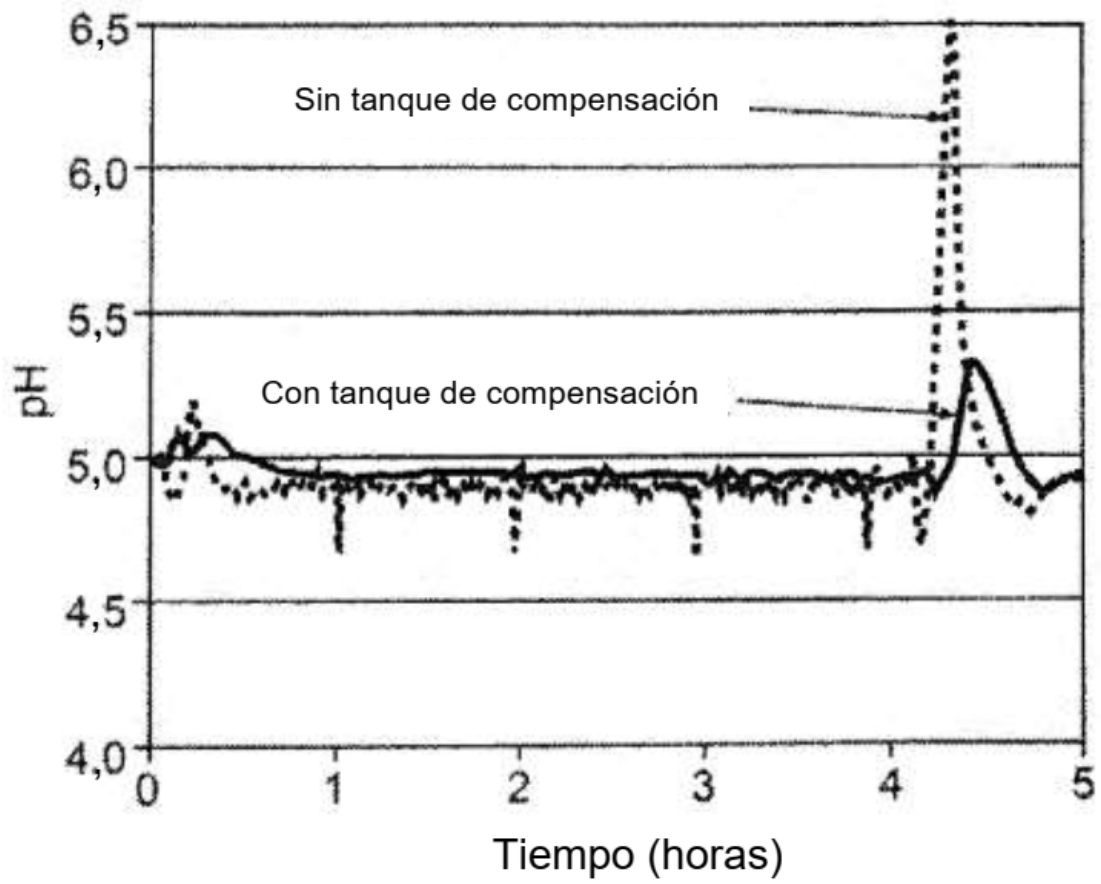


Figura 15

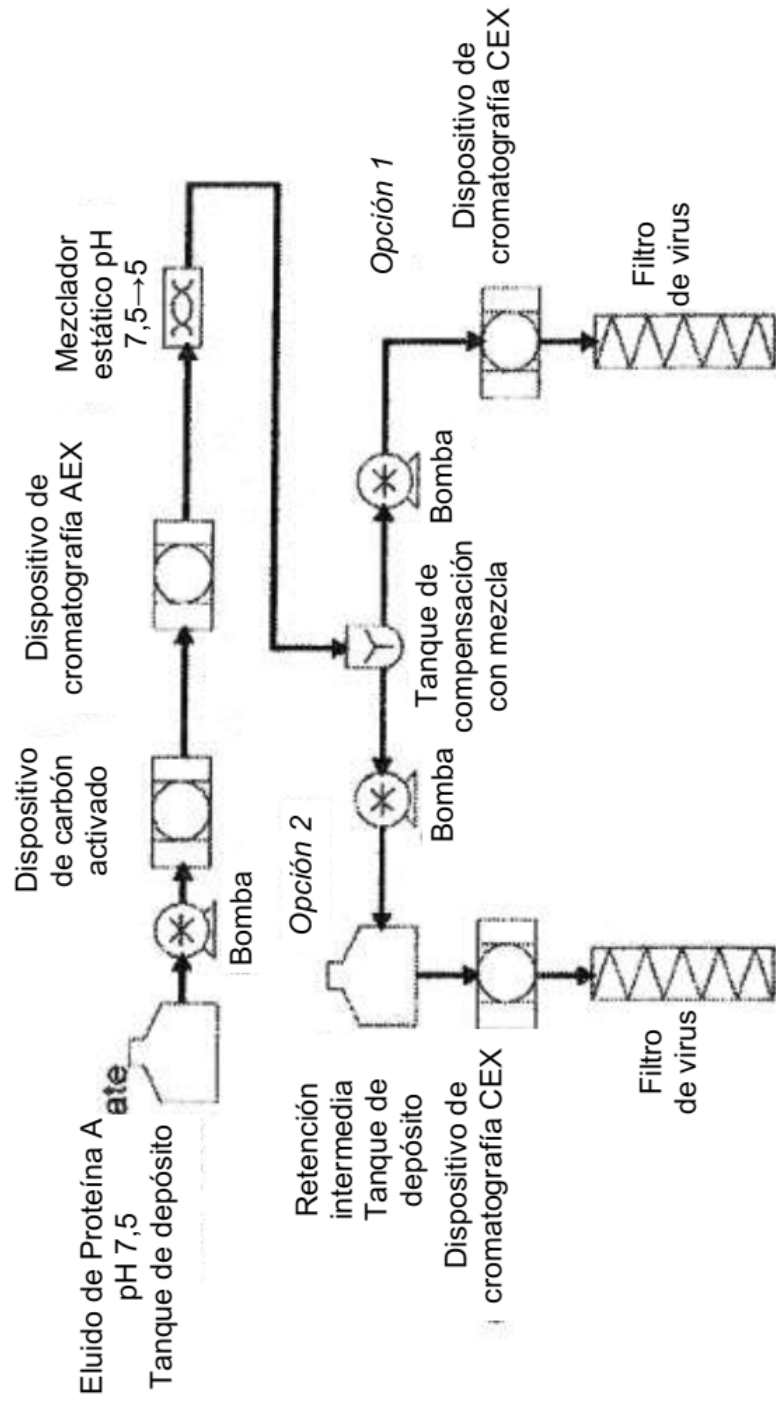


Figura 16

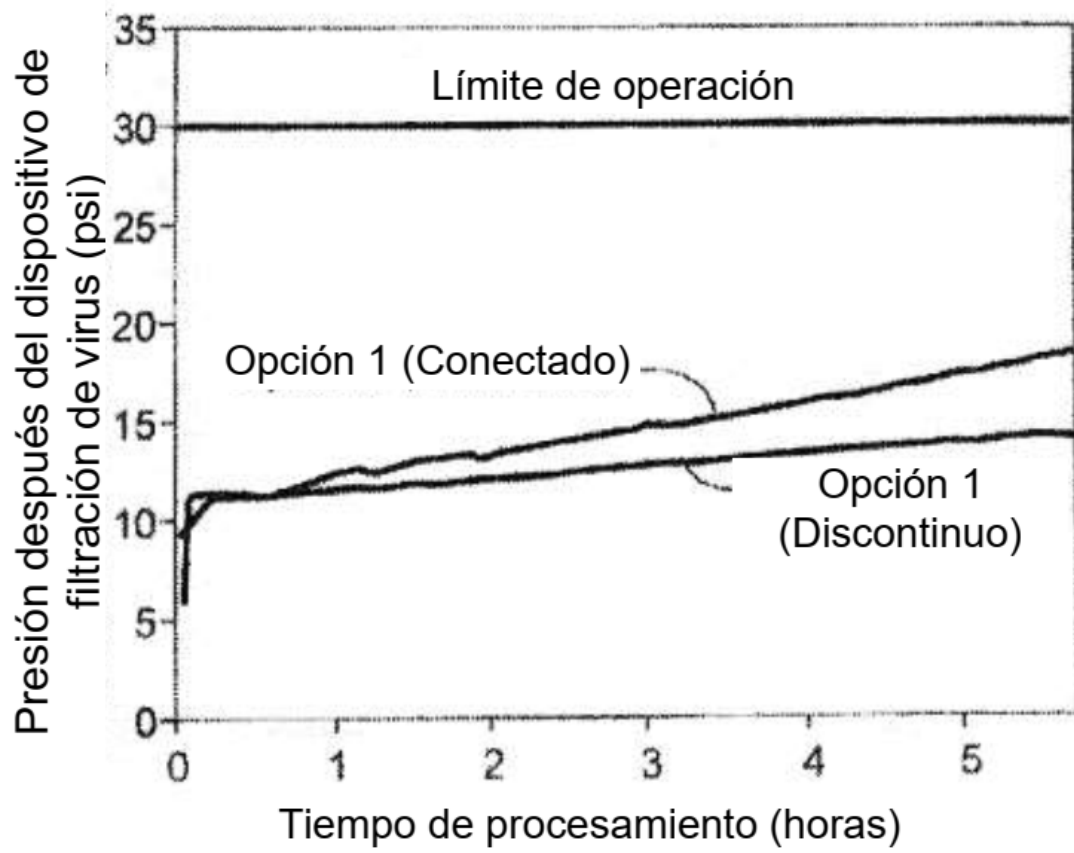


Figura 17

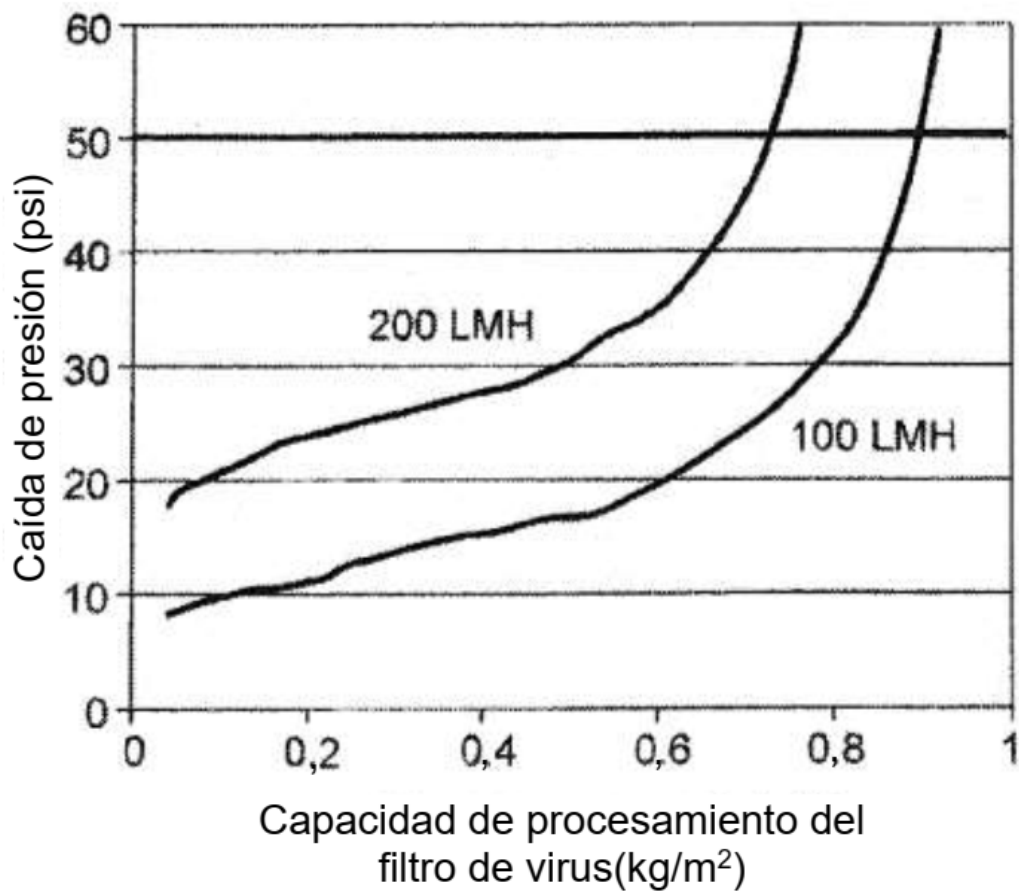


Figura 18

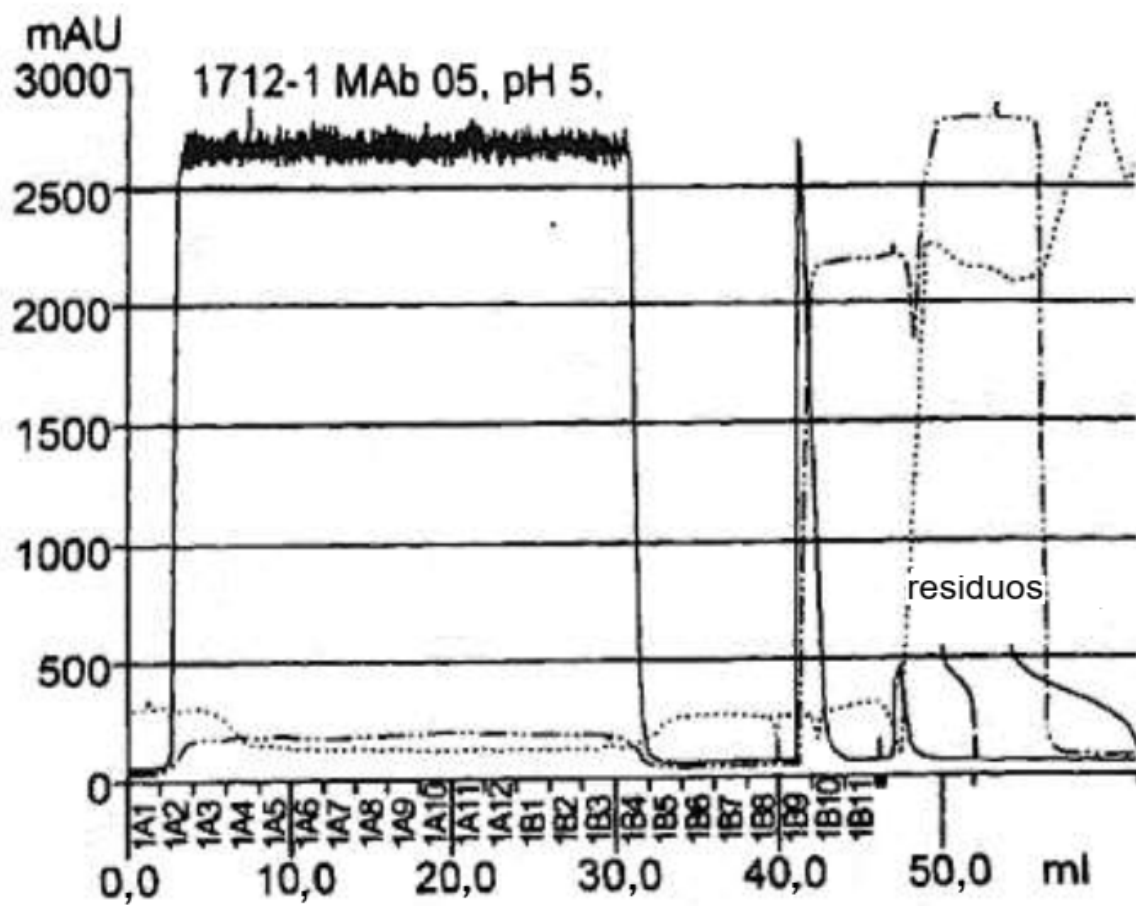


Figura 19

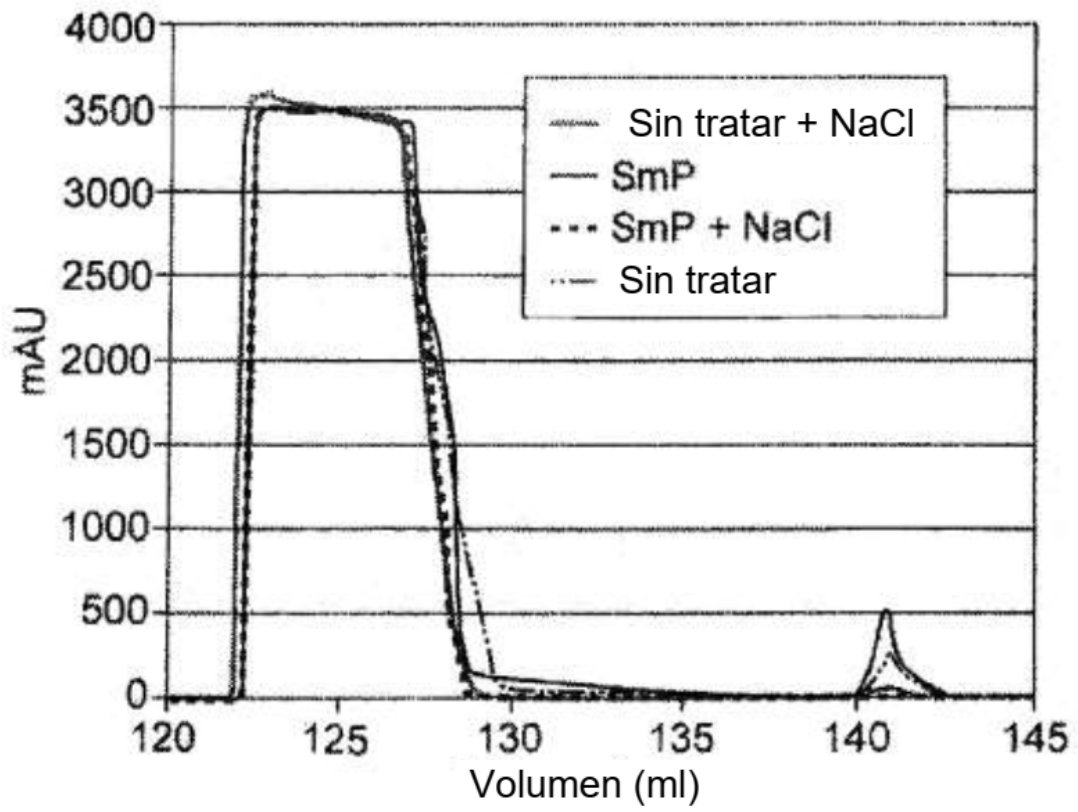


Figura 20

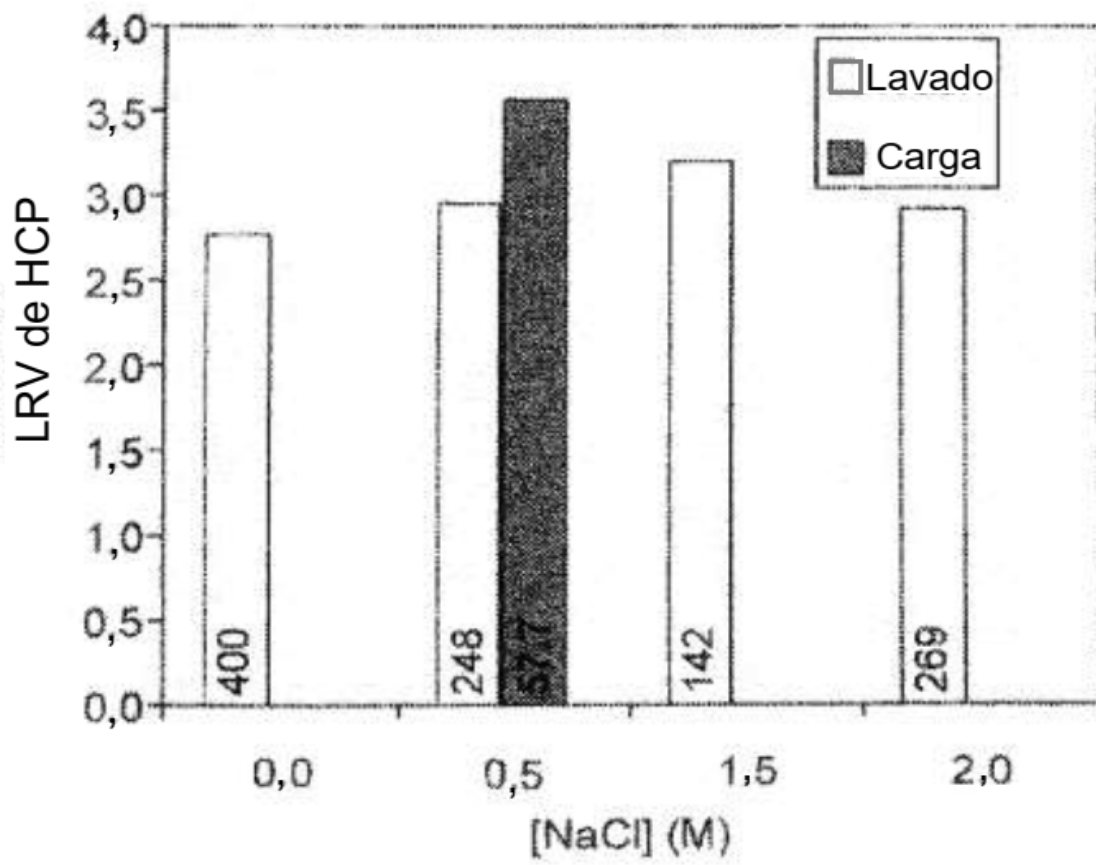


Figura 21

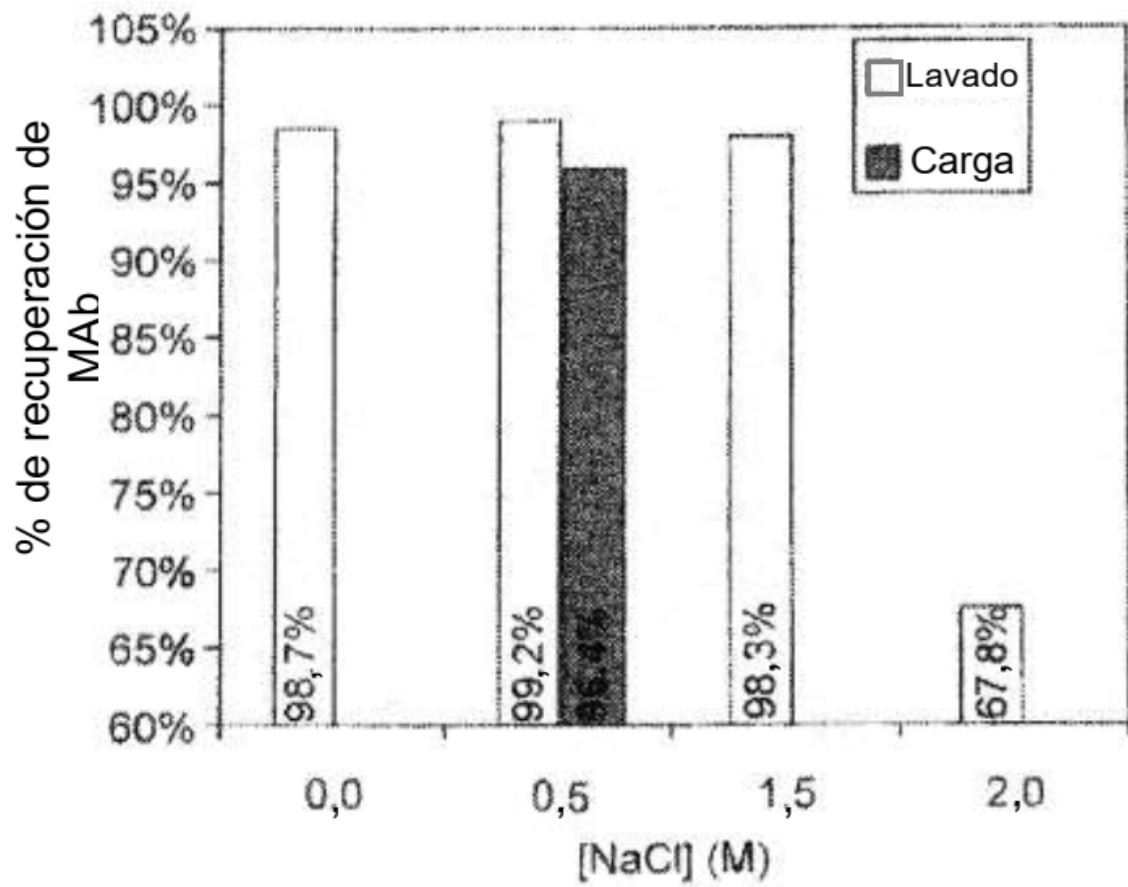


Figura 22

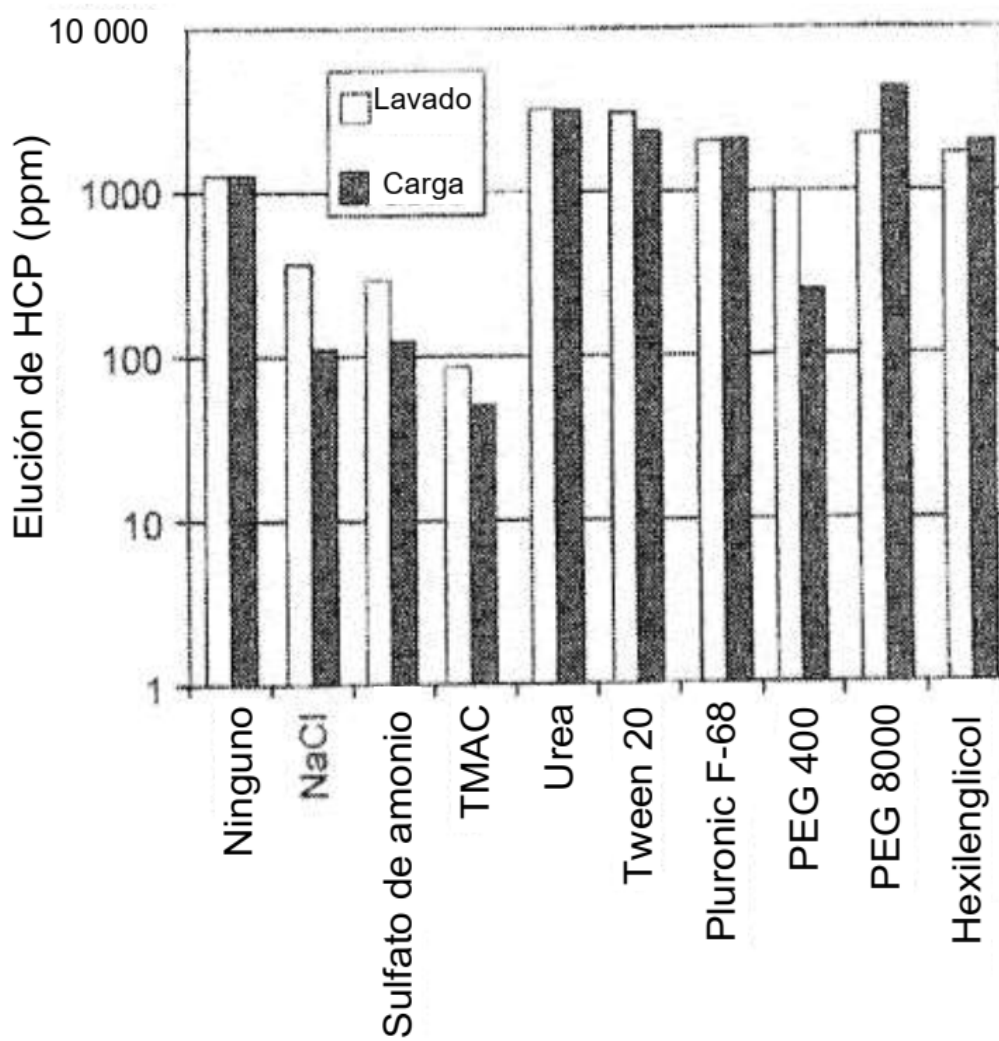


Figura 23

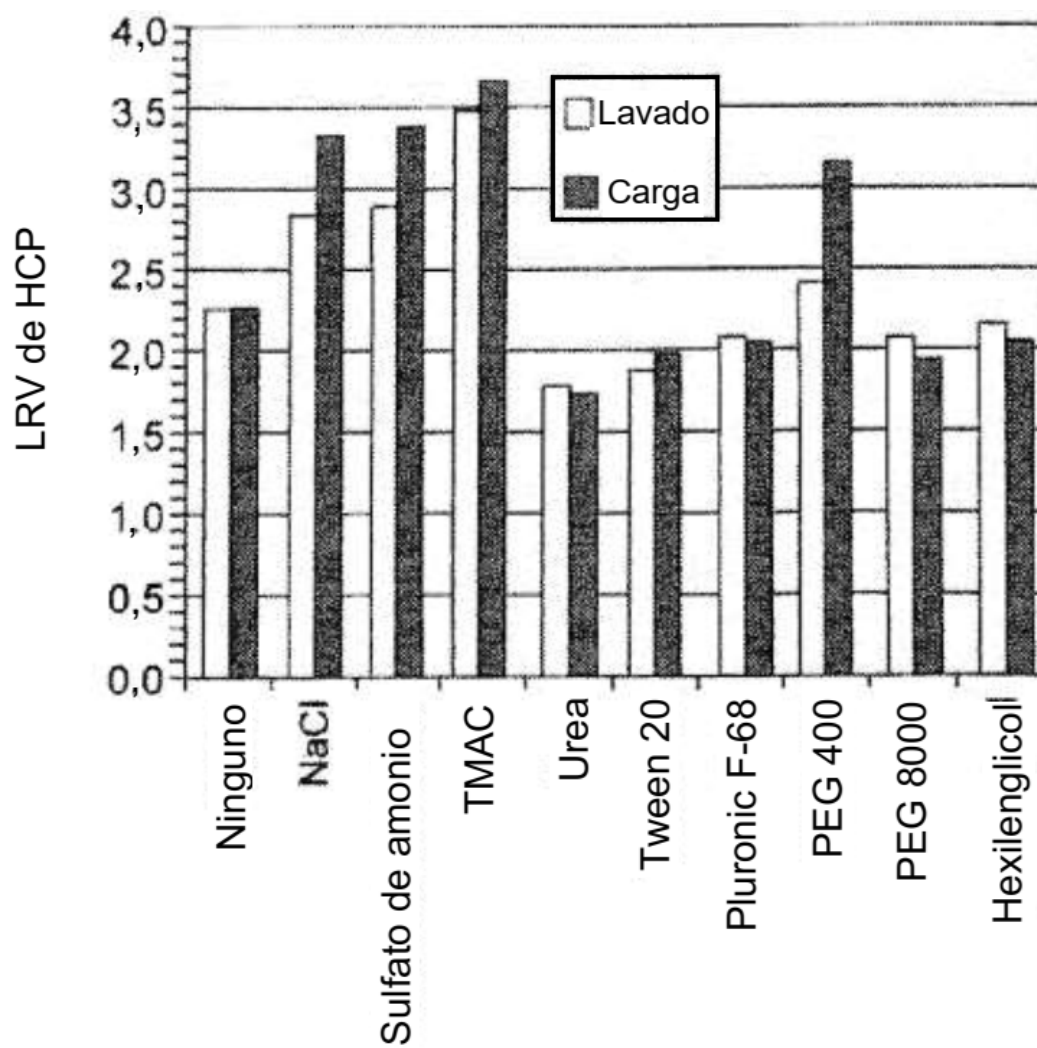


Figura 24

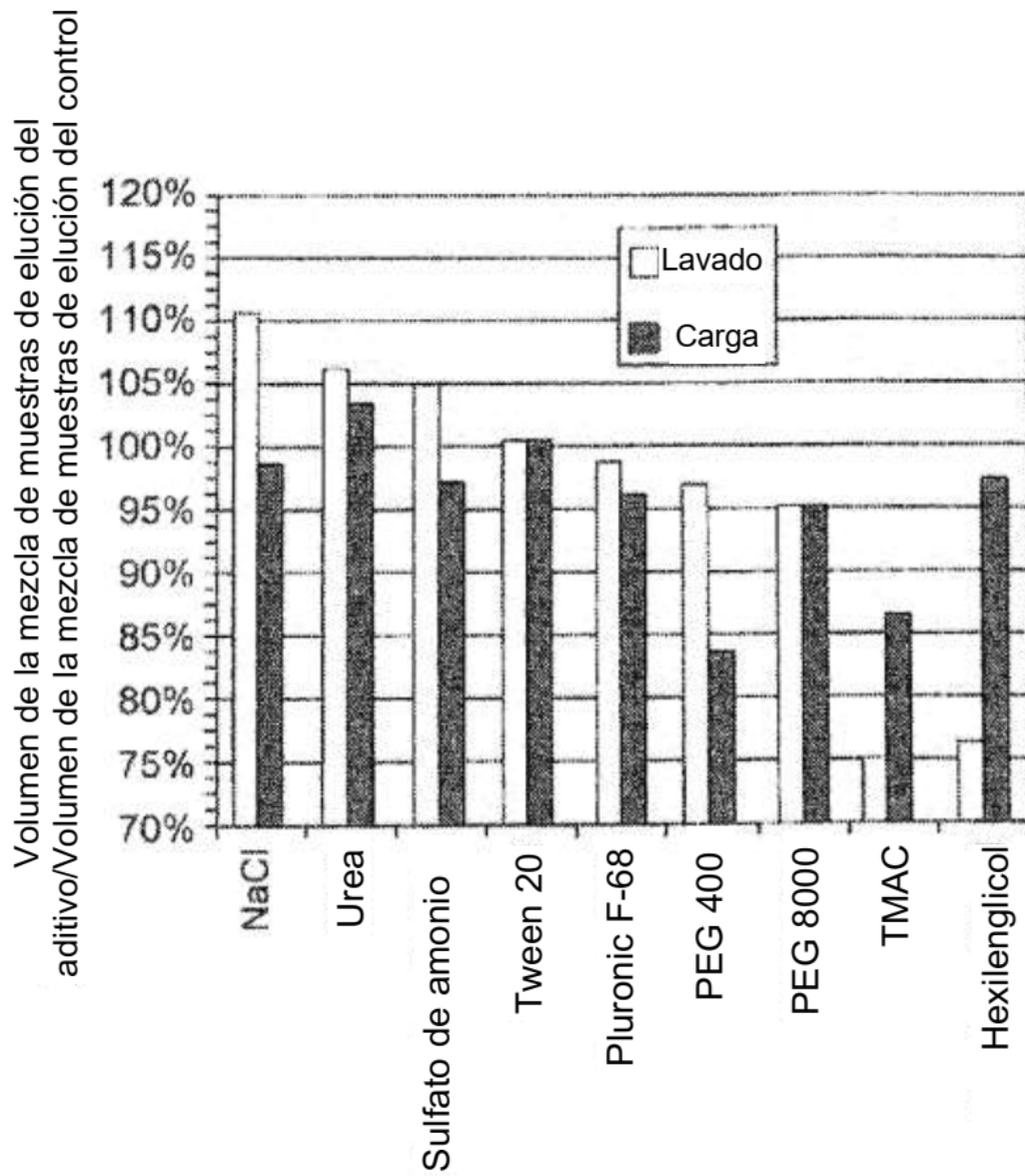


Figura 25