



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

(11) BR 112017023246-4 B1



(22) Data do Depósito: 25/04/2016

(45) Data de Concessão: 08/09/2021

(54) Título: MÉTODO PARA INATIVAÇÃO CONTÍNUA DE VÍRUS A PARTIR DE UMA CORRENTE DE PRODUTO EM UM MICRORREATOR

(51) Int.Cl.: A61L 2/00; B01J 19/00; A61L 2/04; A61L 2/10.

(30) Prioridade Unionista: 28/04/2015 EP 15165505.7.

(73) Titular(es): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

(72) Inventor(es): PETER SCHWAN; ANDREA VESTER; MARTIN LOBEDANN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2016059169 de 25/04/2016

(87) Publicação PCT: WO 2016/173982 de 03/11/2016

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/10/2017

(57) Resumo: MÉTODO PARA INATIVAÇÃO CONTÍNUA DE VÍRUS EM UM MICRORREATOR. A invenção oferece um método para inativação contínua de vírus. O curso do produto é segmentado pela introdução de um meio de separação que é imiscível com o curso do produto, e o curso do produto segmentado é transportado para um reator 1 como segmento de detenção sob condições de inativação do vírus para o período de detenção exigido.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**“MÉTODO PARA INATIVAÇÃO CONTÍNUA DE VÍRUS A PARTIR
DE UMA CORRENTE DE PRODUTO EM UM MICRORREATOR”.**

[0001] A presente invenção está relacionada a um método para inativação contínua de vírus em um segmento do período de detenção.

[0002] Os processos de produção biofarmacêutica exigem várias etapas ortogonais para a redução de vírus. Um método frequentemente usado para inativar vírus (revestidos) é o contato com um meio ácido.

[0003] A inativação de vírus a um pH baixo no modo por lotes é conhecida e frequentemente empregada na produção biofarmacêutica de ingredientes ativos, por ex., anticorpos (Sofer 2003, Virus Inactivation in the 1990s - and into the 21st Century. Parte 4. BioPharm International). Neste caso, o material que deve ser inativado e um líquido que contém potencialmente vírus ativos, são introduzidos em um recipiente apropriado, ajustado para um $\text{pH} \leq 4$ usando uma solução ácida, se necessário homogeneizado e permitido repousar o tempo necessário. A inativação dos vírus ocorre como resultado do contato dos vírus com a solução ácida ao longo de um tempo definido dependente do produto e dependente do processo. Todo o conteúdo da bolsa, portanto, experimenta a inativação com um período de detenção praticamente idêntico e, consequentemente, a redução do vírus é também praticamente idêntica em cada elemento fluido do recipiente.

[0004] Se agora um processo para a produção de produtos biofarmacêuticos e biológicos, em particular anticorpos farmacêuticos, deve ser executado no modo de operação contínua, então o tempo de espera (= período de detenção) exigido deve ser efetuado para a inativação do vírus.

[0005] A inativação contínua de vírus, no contexto da aplicação,

significa que a alimentação da corrente de alimentação no módulo de inativação de vírus e a remoção da corrente de produtos do módulo de inativação de vírus continuam sem pausa.

[0006] Uma possibilidade para executar a inativação contínua de vírus é a irradiação com luz UV-C. Os documentos WO2002038191, EP1339643B1, EP1464342B1, EP1914202A1 e EP1916224A1 descrevem o uso de um circuito de detenção helicoidal no qual o material a ser inativado é irradiado com luz UV-C e os vírus presentes são, portanto, inativados. Se um fluido fluir através de um tubo helicoidal, a força centrífuga atuará no fluido. Essas forças centrífugas induzem correntes secundárias (que são denominadas vórtices de Dean), o que leva a uma corrente radial melhorada e, portanto, uma irradiação mais homogênea do material a ser inativado. A estrutura helicoidal usada nessas fontes é uma bobina helicoidal linear sem alterações na direção dos eixos da hélice. Para a aplicação de uma inativação contínua de vírus a um pH baixo, o uso de uma estrutura helicoidal direta, como é usado na irradiação UV-C, não é praticável, uma vez que, embora a distribuição do período de detenção seja mais limitada que no tubo direto com fluxo laminar, ainda é muito ampla. Devido à distribuição ainda comparativamente ampla do período de detenção, essa geometria exigiria, adicionalmente, grandes instalações para a inativação do vírus pH.

[0007] Em um fluxo de tubo laminar, forma-se um perfil de velocidade parabólica, como resultado do qual ocorre uma ampla distribuição do período de detenção (Fig. 1). Uma vez que a velocidade máxima no centro da corrente do tubo é o dobro da velocidade mediana, mas nas paredes do tubo a velocidade é igual a zero (condição de aderência), nesses casos ocorre uma distribuição muito ampla do período de detenção. Os períodos de retenção resultantes estão entre metade do período médio de detenção

(causado pelos elementos que fluem em fluxo rápido no centro do tubo) e um período de detenção infinitamente longo (causado pelos elementos fluidos aderentes na proximidade da parede). Uma vez que, em primeiro lugar, para a inativação eficaz dos vírus, é necessário um período de detenção mínimo e, em segundo lugar, no entanto, períodos de detenção prolongados a um pH baixo podem danificar o produto (como, por exemplo, uma proteína), alcançar uma distribuição de período de detenção limitado em operação contínua é vital. Uma mudança da situação da corrente laminar para um fluxo em pistão turbulento com um período de detenção uniforme, neste caso, não é uma alternativa aceitável. Os fluxos turbulentos assumem altas velocidades de fluxo. Se, então, forem obtidos os longos períodos de detenção habituais para inativações de vírus a um pH baixo (por exemplo, 60 - 120 min), a desvantagem é a formação de grandes plantas que também possuem uma queda de alta pressão.

[0008] O documento WO1998/02237 descreve uma solução para o problema do perfil de velocidade parabólica em um reator tubular continuamente operado para precipitar produtos de uma mistura de reação líquida pela aplicação de um procedimento segmentado (Processos de Fluxo Segmentado), em que os volumes distintos da mistura de reação são separados de volumes distintos de um líquido de separação que é imiscível na mistura da reação, em que o período de detenção da mistura da reação no reator tubular é suficiente para a precipitação. Os volumes discretos são gerados sob condições de fluxo em pistão e, para cada volume, as condições de reação são consideravelmente idênticas, de maneira que um produto uniforme seja obtido para cada volume.

[0009] Tuercke et al. descreva a condução segmentada - líquido/líquido ou líquido/gás - em reatores microestruturados em operação contínua para a síntese orgânica e a produção de produtos

microparticulados, como, por exemplo, emulsões múltiplas e nanopartículas e polimerização (Organic Process Research & Development 2009, 13, 1007–1013). O método da fase segmentada também foi usado pelo Fraunhofer Institute for Chemical Technology ICT para separar células. A técnica de fases segmentadas é, além disso, usada no transporte de amostra no Baychromat® System para amostragem e análise (US 2009/0178495).

[00010] Até à data não foi estudada ou mencionada a aplicabilidade de condições de fluxo em pistão ou fluxo segmentado para métodos que requerem simultaneamente um longo período de detenção e uma distribuição de período de detenção limitada como, por exemplo, inativação de vírus a um pH baixo.

[00011] Com base na técnica anterior, o objetivo era fornecer uma solução nova, simples e barata que permitisse o período de retenção requerido em um segmento de período de detenção com fluxo contínuo para inativação contínua de vírus, em particular a um pH baixo, com uma distribuição de período de detenção limitada.

[00012] A invenção atinge este objetivo por meio de um método para a inativação contínua do vírus de uma corrente de produto que deve ser inativado em um reator 1 com um baixo diâmetro hidráulico de 0,01 mm a 6 mm, de preferência 0,5 mm a 3 mm, compreendendo as seguintes etapas:

- a) Provisão da corrente de produto que deve ser inativado,
- b) Definição das condições de inativação do vírus,
- c) Introdução de um meio de separação que seja imiscível com o curso do produto para segmentá-lo,
- d) Alimentação e passagem através do curso do produto segmentado de (c) sob condições de inativação de vírus em um segmento de detenção formado pelo reator 1,
- e) Fluxo de saída do segmento de detenção,

f) Preferencialmente separação continuamente do meio de separação.

[00013] De preferência, o reator, e também os elementos do módulo para segmentar o curso do produto que entram em contato com o curso do produto, são esterilizáveis, preferencialmente autoclaváveis, irradiáveis em gama ou tratáveis com gás de óxido de etileno (ETO), o que permite uma operação com baixo nível de micróbios ou até mesmo estéril.

[00014] De preferência, o reator é tubular. Particularmente e preferencialmente, é usado um reator tubular em material descartável, por ex., um tubo flexível, que é descartado após o uso para poder dispensar a limpeza. Para essa propriedade, de preferência, é usado um tubo flexível que está em conformidade com os requisitos de qualidade relativos, por ex., qualidade médica (USP Classe VI). Por exemplo, o reator tubular é um tubo flexível de silicone. Como exemplos, os tubos flexíveis Pharmed®-BPT (tubo flexível de silicone), C-Flex-374® (tubo flexível termoplástico) ou Sanipure® da Saint-Gobain Performance Plastics podem ser citados, sem restrição na invenção. Na planta de teste, foi usado um tubo flexível comercial SaniPure® com um diâmetro interno de 1,6.

[00015] A configuração geométrica no comprimento do reator tubular é conforme desejado: reta, espiral ou curva, desde que não se rompa. É dado preferência a um sistema de economia de espaço do reator tubular. Em geral, o reator tubular é suportado por uma estrutura de suporte. Por exemplo, o reator tubular é enrolado em torno de quadros presos um acima do outro em um suporte no qual os quadros podem ser redondos ou quadrados. Um enrolamento helicoidal em torno de uma ou mais colunas também é possível. Para inativação UV, a coluna pode ter uma lâmpada UV e o reator tubular pode ser transparente a UV. Além disso, podem ser estabelecidas condições

térmicas de inativação de vírus por meio do aquecimento da estrutura de suporte no reator tubular. Para a inativação térmica, as estruturas em espiral também podem ser introduzidas em um banho líquido para induzir mudanças de temperatura acentuadas.

[00016] Como alternativa, pode ser usado um reator tubular que é formado por uma ou mais placas empilhadas uma sobre a outra, em particular placas de plástico, nas quais é incorporado um canal com uma entrada e uma saída. Se esse reator de placa compreender várias placas, a entrada e a saída das placas centrais serão posicionadas de maneira que um canal contínuo do comprimento desejado seja formado pelas pilhas. Além disso, a configuração geométrica no comprimento do canal é como desejada: reta, espiral ou curva.

[00017] A seção transversal do reator 1 geralmente é redonda ou oval, mas também pode ser quadrada.

[00018] Na etapa (a), é fornecido uma corrente de produto líquido que pode conter tanto produtos como vírus que podem ser inativos.

[00019] Como possíveis condições de inativação de vírus para a etapa (b), são citados um pH baixo (preferencialmente ≤ 4), detergentes, tratamento UV ou térmico.

[00020] De preferência, na etapa (b), o pH do curso do produto é ajustado para um $\text{pH} \leq 4$, desde que o pH do material a ser inativado ainda não tenha o pH exigido. O pH do curso do produto geralmente é determinado antes da entrada no dispositivo para inativação de vírus por um sensor (Fig. 8). Normalmente, esse sensor de pH não tem tarefas de controle. O registro do sinal de pH serve apenas para monitorar o processo. A definição do pH da solução a ser inativada para ≤ 4 pode prosseguir, por exemplo, por adição de solução de HCl. A solução geralmente é adicionada na execução do dispositivo para inativação de vírus. Após a etapa (e) ou (f), geralmente o pH é

ajustado para > 4 usando uma base, por exemplo, solução de hidróxido de sódio (NaOH), para terminar a inativação do vírus. A neutralização pode ser realizada como uma operação em lote ou como um método de produção contínua e assim ser integrada em um processo em lote ou em um processo contínuo.

[00021] Como agente de separação, no método de acordo com a invenção, é usada uma fase que é imiscível no curso do produto. De preferência, o agente de separação é um óleo ou um gás como, por exemplo, ar, CO₂ ou nitrogênio, de preferência um gás, particularmente e preferencialmente nitrogênio, devido à inércia de reação em relação ao curso do produto e baixa solubilidade na corrente de produto aquoso.

[00022] Para a introdução do agente de separação e a segmentação do curso do produto na etapa (c), o reator geralmente, além de uma entrada 4, tem uma entrada 6 para o agente de separação geralmente na forma de uma peça em T, à qual um meio para a introdução de um pulso no agente de separação - ou uma válvula de abertura acionada tendo uma linha de pressão fixa ou uma bomba - está conectado (Figura 3). A segmentação prossegue, por exemplo, com uma bomba com uma taxa de pulso de 0,1 a 200 pulsos por minuto.

[00023] Normalmente, o curso do reator flui através de uma taxa de fluxo volumétrico de 1 a 1000 L/min, de preferência 10 a 100 mL/min.

[00024] Como alternativa à introdução pulsada, o agente de separação pode ser alimentado continuamente por uma membrana. Nesta representação, é usado um módulo para segmentar o curso do produto que compreende uma ou mais fibras oca com uma parede hidrofóbica, através da qual o agente de separação é introduzido no curso do produto. Também é possível empregar um módulo de fibra oca com uma parede hidrofílica, em que no lúmen das fibras oca, o

agente de separação é continuamente transportado e introduzido através da parede do curso do produto. Essa segunda representação pressupõe que os poros das fibras ocaas sejam permeáveis ao produto. O uso de uma segmentação de membrana geralmente pressupõe que a condição de inativação do vírus não prejudica as propriedades necessárias da membrana. Quando os detergentes são usados, o emprego de uma peça em T é, portanto, preferencial.

[00025] A introdução química de um agente de separação, por ex., CO₂, também seria possível, em particular se a condição de inativação de vírus tolerasse variações de pH.

[00026] Por tais segmentações do curso do produto, normalmente são formados volumes de corrente de produto de 0,1 mL a 100 mL com separações de volume de 0,1 mL a 10 mL entre dois volumes de corrente de produto.

[00027] Geralmente, o comprimento mínimo de um segmento, em particular de um segmento de agente de separação, é três vezes o diâmetro interno do reator. Um comprimento máximo razoável de um segmento é um quinto do segmento de detenção.

[00028] Devido à ação capilar e à tensão superficial no reator, a segmentação das fases é mantida de tal maneira que dois segmentos de uma fase são separados por um segmento da outra fase. Como resultado, a mistura posterior entre dois segmentos de uma fase é minimizada e a distribuição do período de detenção do sistema geral diminuiu muito.

[00029] Os segmentos de corrente de produtos transportados individualmente (= volumes de corrente de produto) podem ser considerados pequenos recipientes de inativação que são sempre completamente esvaziados e também misturados apenas minimamente entre si.

[00030] Geralmente a corrente de produto na etapa (d) é

alimentado e transportado para o reator com uma velocidade de fluxo de 0,1 a 1000, de preferência 1 a 100, particularmente preferencialmente de 10 a 100 mL / min, normalmente com o uso de uma bomba. Nessa etapa, o tempo de contato desejado (= período de detenção) entre as condições de inativação de vírus, em particular a solução ácida e qualquer vírus presente, prossegue. O período de detenção é suficientemente longo para inativar os vírus sem prejudicar demais o produto. Geralmente, é determinado experimentalmente em um método de lote, antes de ser convertido em um método contínuo e é tipicamente de 30 min para produtos sensíveis ao pH até 10 h para produtos menos sensíveis. O período de detenção requerido e também o período de detenção máximo dependem do produto. O período de detenção máximo geralmente é otimizado de forma que o produto seja danificado minimamente, a fim de manter o requisito de etapas de purificação a favor do curso o menor possível.

[00031] Como parâmetros de projeto para o método de acordo com a invenção, pode ser mencionado de forma correspondente:

- Diâmetro interior do tubo d_i do reator
- Comprimento do tubo L , em que o comprimento do tubo L e o diâmetro interno do tubo são adaptados às dimensões da velocidade total da planta/fluxo da planta de maneira que os períodos de detenção exigidos no respectivo caso de aplicação sejam atendidos
- Taxa de fluxo volumétrico desejado, volume do curso do produto, volume do agente de separação e taxa de pulso.

[00032] O agente de separação geralmente é separado continuamente por um separador que atua por gravidade, força centrífuga ou por propriedades da membrana.

[00033] Se um gás é usado como agente de separação, a corrente de volume geralmente é desgaseificado continuamente. Para este fim, pode ser utilizada uma armadilha de bolhas, uma válvula de ventilação

ou, de preferência, um módulo de desgaseificação de membrana.

[00034] Se o processo de produção exigir um ou mais ajustes do pH, o dispositivo para inativação de vírus geralmente estará conectado a uma unidade para ajustar o pH. Normalmente, são usadas duas unidades para o ajuste do pH, o primeiro contra curso da inativação para ajustar o curso do produto para um $\text{pH} \leq 4$, além da inativação para neutralizar a curso do produto.

[00035] Se o dispositivo para inativação de vírus estiver integrado em um processo de produção contínuo, será preferencial uma ou mais unidades para ajustar o pH, em que o curso do produto flui através de um circuito de recirculação. A Fig. 8 representa a inativação do vírus e uma subsequente neutralização a título de exemplo, sem se limitar a isso. A M0503 transporta o curso do produto para a bolsa B0502 onde o pH é ajustado depois que ele sai da inativação do vírus no $\text{pH} \geq 4$. A bomba de recirculação M0504 transporta o conteúdo da bolsa B0502 através do circuito de recirculação em que o sensor de pH pH0502 mede o pH do curso do produto. Sentido a favor do curso do sensor pH 0502, o agente de ajuste para a adaptação do pH é adicionado para controlar o pH. Isso ocorre por meio da configuração padrão da velocidade de rotação para M0505.

[00036] No método de acordo com a invenção, o curso do produto a ser inativado geralmente é uma solução de um biorreator ou uma coluna de cromatografia, em particular uma proteína ou solução de peptídeo como, por exemplo, uma solução de anticorpo.

[00037] A vantagem técnica da inativação de vírus contínua de acordo com a invenção em comparação com a inativação do vírus no modo de lote que é convencional na técnica anterior está em sua capacidade de ser integrada em um processo de processamento contínuo, também denominado "processamento a favor do curso", sem precisar alterar o procedimento do processo. Neste caso, não há

mudança no procedimento do processo do lote para o contínuo e volta novamente, mas todo o processamento a favor do curso ou, opcionalmente, todo o processo de produção (contra e a favor do curso) pode ser executado continuamente. Além disso, a inativação contínua do vírus pode ser mais facilmente combinada com uma subetapa contínua de um processo de processamento de lote.

[00038] A presente invenção, incluindo formas de realização preferenciais, é explicada em combinação com os desenhos e exemplos a seguir, sem se restringir a isso. As representações podem ser combinadas como desejado entre si, desde que o contrário não resulte claramente do contexto.

[00039] Os sinais de referência utilizados são:

1 = Tubo curvo e/ou helicoidal em espiral ou tubo flexível

2 = Inversão de direção e/ou dobra 2 do eixo da bobina h tendo um ângulo \square de 45° a 180°

3 = Quadro

4 = Entrada

5 = Saída

6 = Sustentação

7 = Pé

8 = Linha de fluxo do produto

[00040] A Fig. 1 mostra um perfil de fluxo parabólico do tubo com fluxo laminar (parte superior: seção longitudinal do tubo). Linhas de igual velocidade na direção da corrente no tubo com fluxo laminar (parte inferior: seção transversal do tubo).

a = Parede do tubo

b = Direção axial do tubo na direção da corrente

c = Direção radial

d = Linhas de velocidade de fluxo igual na direção da corrente.

[00041] A Fig. 2 mostra o princípio da segmentação.

[00042] A Fig. 3 mostra meios alternativos para a introdução pulsada do agente de separação ligado ao reator tubular.

[00043] A Fig. 4 mostra um diagrama de fluxo da inativação do vírus com posterior adaptação do pH, em que o dispositivo para inativação de vírus é mostrado apenas esquematicamente.

[00044] A Fig. 5 mostra um quadro quadrado para enrolar o tubo do reator.

[00045] A Fig. 6 mostra vários quadros montados em um suporte.

Exemplo 1:

[00046] Para os estudos experimentais, foi selecionado um diâmetro interno do tubo flexível de 1,6 mm. O reator tubular foi enrolado em quadros com as seguintes dimensões:

[00047] Diâmetro do quadro de 63 mm; comprimento da borda exterior do quadro 195 mm. O quadro foi fabricado de acordo com a Fig. 5 e montado em um suporte de acordo com a Fig. 6.

[00048] Em cada caso, foram instaladas 11 bobinas com uma separação mínima por braço. O comprimento do tubo flexível usado por quadro é proporcional ao diâmetro do quadro com a hipótese de um número constante de bobinas por braço.

[00049] Neste caso, a saída do quadro superior foi conectada à entrada do quadro abaixo dele de maneira que a bobina do tubo flexível do quadro se deslocou de cima para baixo. Como alternativa, também é possível que o fluxo flua de baixo para cima ou na horizontal.

[00050] Uma taxa volumétrica de cerca de 3 mL/min fluiu pela planta de teste.

[00051] Os experimentos de medição do período de detenção no dispositivo para inativação contínua de vírus foram realizados com o uso de uma medida de UV na saída do sistema.

[00052] A substância rastreadora usada foi uma solução de

vitamina B12 com uma concentração de 0,25 g / l, uma vez que a vitamina B12 absorve a luz UV a um comprimento de onda de 280 nm e, portanto, é adequada como indicador.

[00053] Primeiro, o dispositivo foi purificado com água destilada. No momento k, na entrada da inativação do vírus, o sistema foi alternado para a solução rastreadora e a gravação do sinal de medição do sensor UV foi iniciada (consequentemente, uma função de etapa da solução rastreadora foi aplicada ao sistema). Quando o sinal UV na saída do sistema correspondeu ao sinal UV da solução rastreadora, os experimentos puderam ser encerrados, já que o sistema, a partir desse momento, foi completamente preenchido com a solução rastreadora e, portanto, a resposta do sistema à função de etapa foi completamente registrada.

[00054] O trabalho que levou a esta aplicação foi financiado conforme acordo de auxílio financeiro “Bio.NRW: MoBiDiK – Modular bioproduction – disposable and continuous” no escopo do European Fund for Regional Development (EFRD).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para inativação contínua de vírus a partir de uma corrente de produto, que deve ser inativado em um reator (1) com um diâmetro hidráulico de 0,01 mm a 6 mm, ou de 0,5 mm a 3 mm,

o referido método sendo caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

- (a) Prover a corrente de produto que deve ser inativado,
- (b) Ajustar as condições de inativação do vírus, estabelecendo um pH de ≤ 4 , por detergentes, tratamento UV ou térmico,
- (c) Introduzir, na corrente de produto, um meio de separação que seja imiscível com a corrente de produto para segmentá-lo,
- (d) Alimentar e passar através da corrente de produto segmentado de (c) sob condições de inativação de vírus em um segmento de detenção formado pelo reator (1), e
- (e) Fluxo de saída do segmento de detenção.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que, na etapa (b), o pH do fluxo do produto é ajustado para ≤ 4 , desde que o pH do material a ser inativado ainda não apresente o pH requerido.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo fato de que a solução que deve ser inativada é uma solução de macromoléculas, ou uma solução de proteína ou peptídeo, ou uma solução de anticorpo.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma etapa (f), sendo que, na dita etapa (f), o meio de separação é separado continuamente.

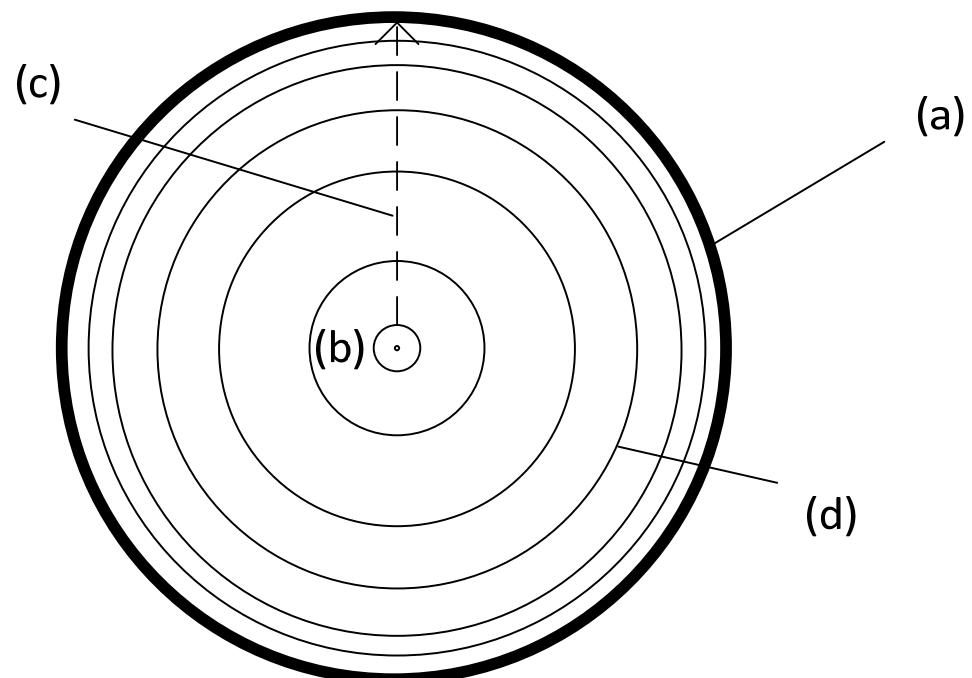
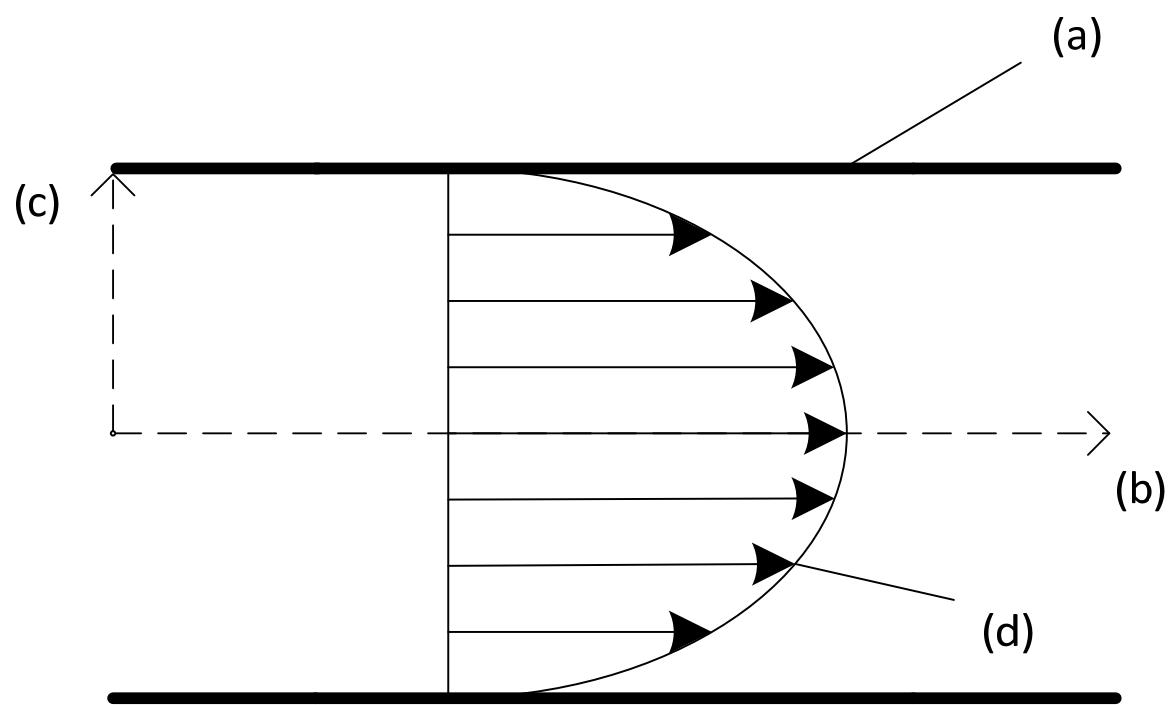


Fig. 1

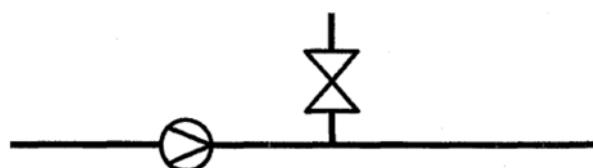


Fluxo segmentado com superfícies hidrofóbicas

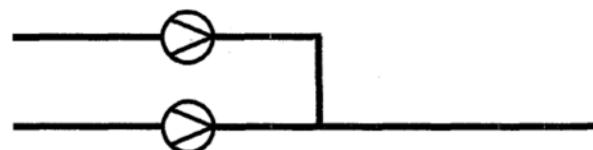


Fluxo segmentado com superfícies hidrófilas

Fig. 2



Introdução de gás via válvula controlada



Introdução de gás via bomba controlada

Fig. 3

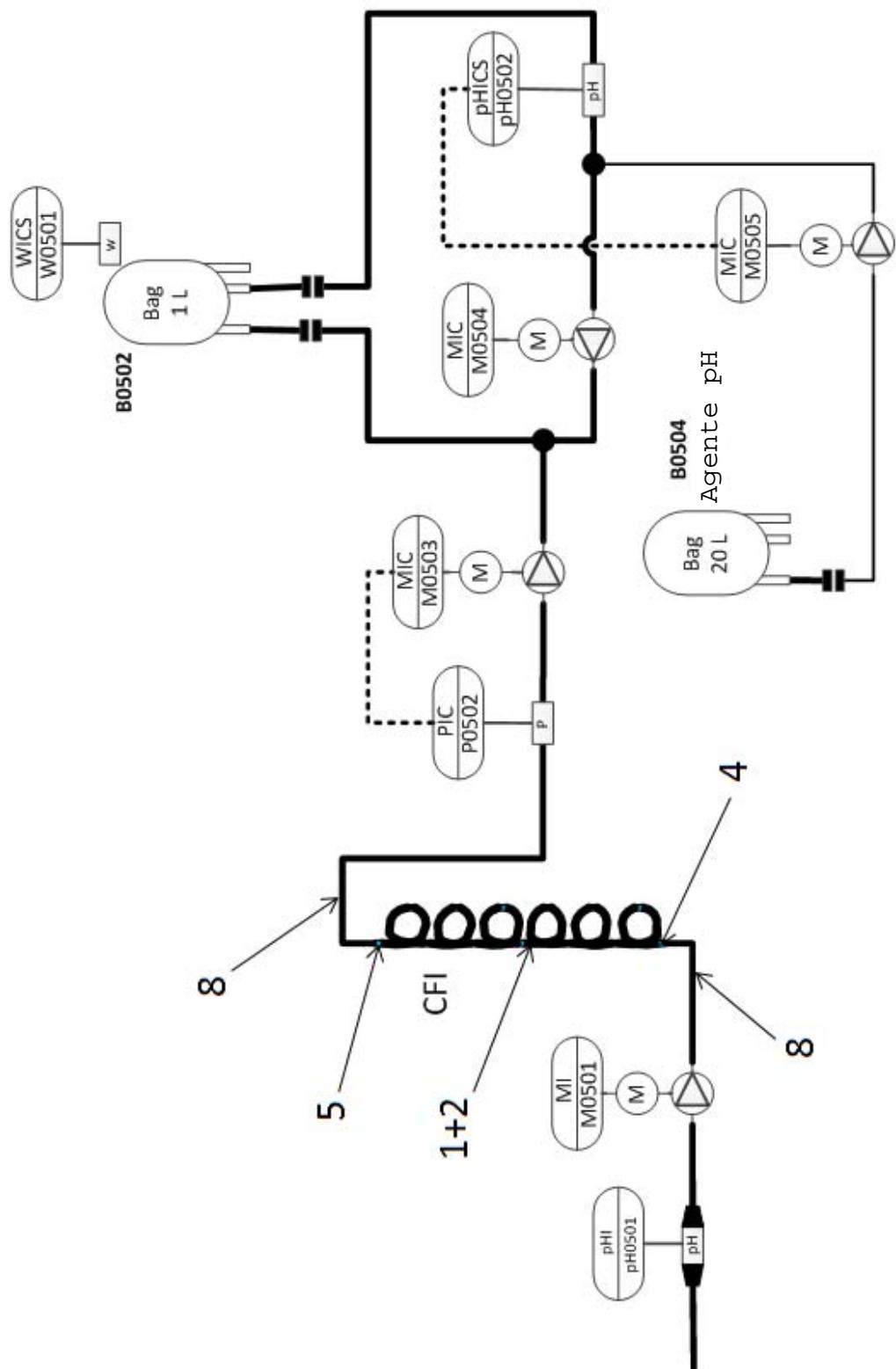


Fig. 4

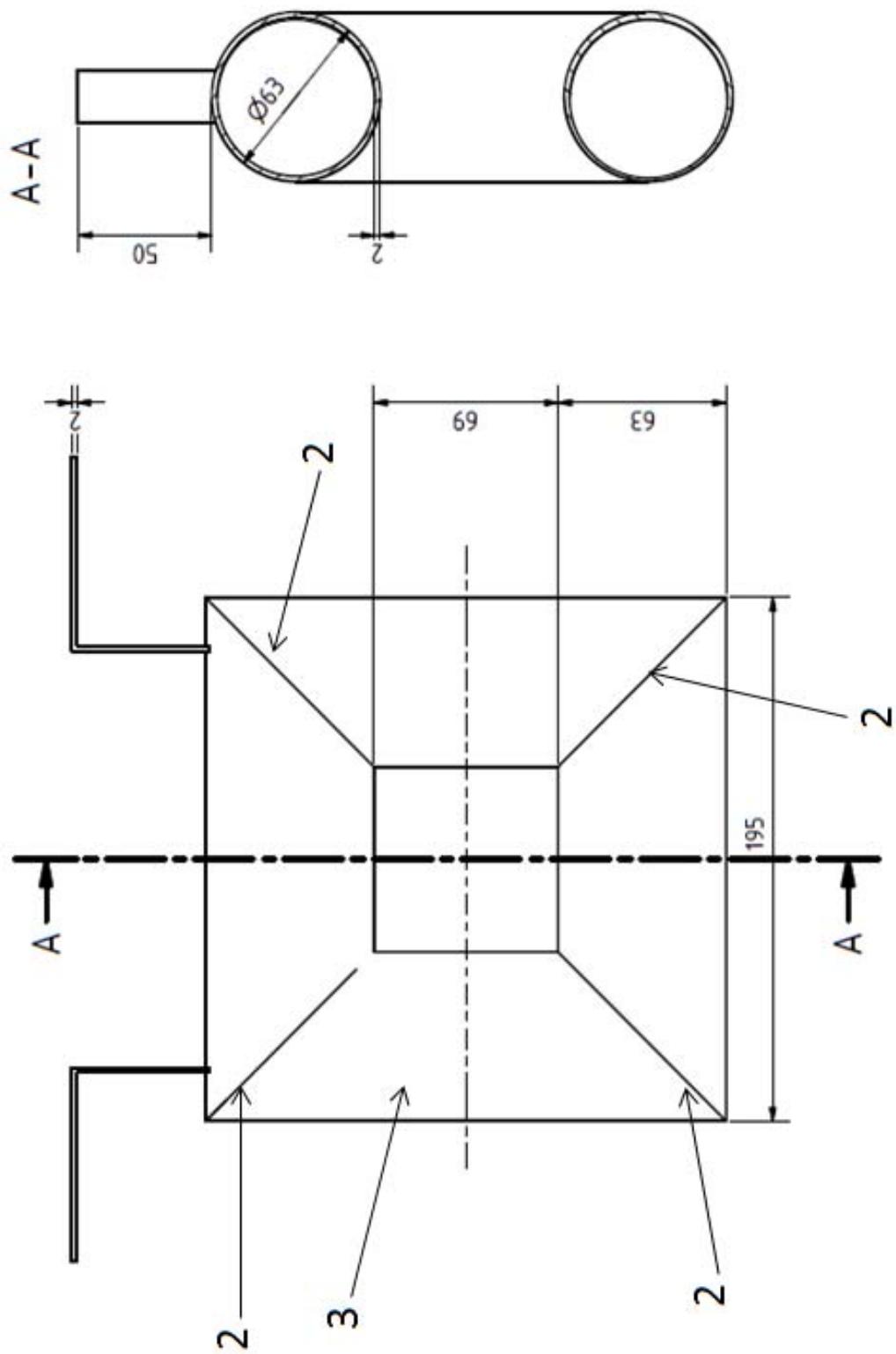


Fig. 5

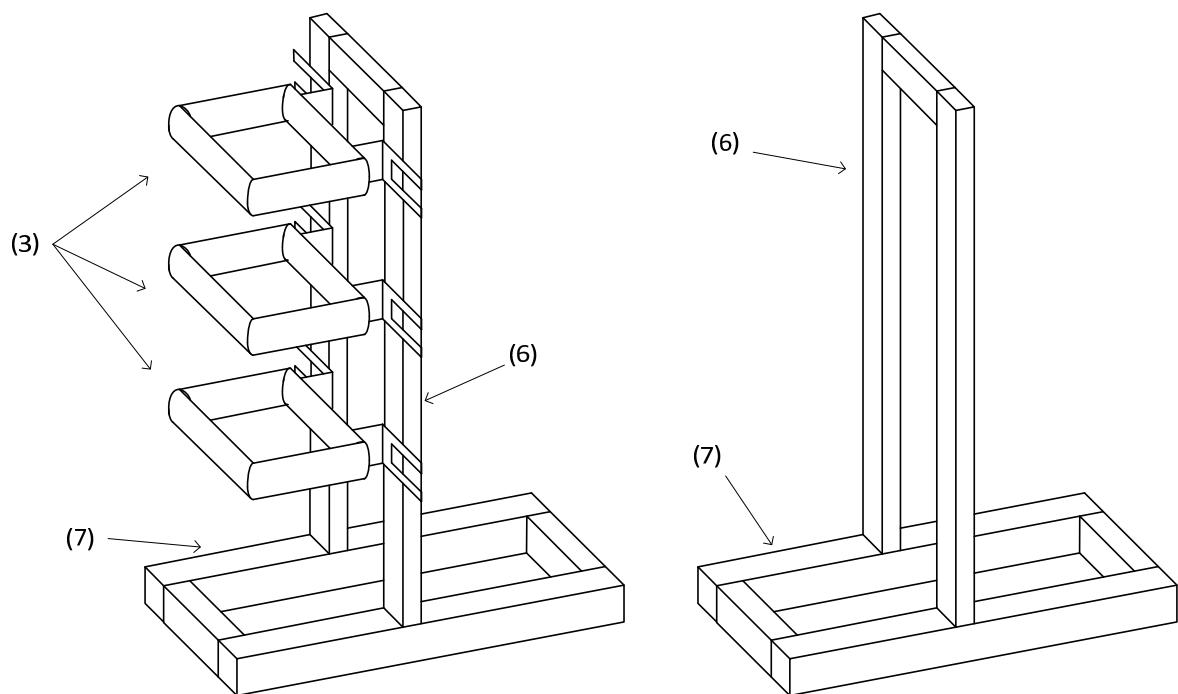


Fig. 6