

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 895 173**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/04** (2006.01)

**C12N 7/06** (2006.01)

**C07K 1/16** (2006.01)

**C07K 1/36** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2013 PCT/US2013/045677**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14004103**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2013 E 13810248 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.09.2021 EP 2867359**

54 Título: **Métodos para inactivar virus durante un proceso de purificación de proteínas**

30 Prioridad:

**29.06.2012 US 201261666145 P**

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

**17.02.2022**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**XENOPOULOS, ALEX**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

ES 2 895 173 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**

Métodos para inactivar virus durante un proceso de purificación de proteínas

5      Campo de la invención

La presente invención proporciona métodos en línea para inactivar virus durante un proceso de purificación de proteínas.

10     Antecedentes de la invención

La purificación económica y a gran escala de proteínas terapéuticas y especialmente de anticuerpos monoclonales es un problema cada vez más importante para la industria biotecnológica. Generalmente, las proteínas se producen mediante cultivo celular, mediante el uso de líneas celulares de mamíferos o bacterias diseñadas genéticamente para producir la proteína de interés, como un anticuerpo monoclonal. Sin embargo, una vez producidas, las proteínas deben separarse de diversas impurezas, tales como proteínas de la célula huésped (HCP), endotoxinas, virus, ADN, etc.

El documento WO 2012/078677 A2 se refiere a los métodos de procesamiento continuo de productos biológicos.

20     En un proceso de purificación típico, una vez que se expresa una proteína de interés en el cultivo celular, la alimentación del cultivo celular se somete a una etapa de clarificación para eliminar los restos celulares. El alimento de cultivo celular clarificado que contiene la proteína de interés se somete después a una o más etapas de cromatografía, que pueden incluir una etapa de cromatografía de afinidad o una etapa de cromatografía de intercambio catiónico. Para garantizar la seguridad de una proteína de interés, especialmente en el caso de un candidato terapéutico, es necesario inactivar cualquier virus que pueda estar presente en una muestra que contiene la proteína de interés durante el proceso de purificación. Generalmente, la inactivación de los virus se realiza después de una etapa de cromatografía (por ejemplo, después de la cromatografía de afinidad o después de la cromatografía de intercambio catiónico). Por lo general, en un proceso a gran escala, después de una etapa de cromatografía, un material de elución que contiene la proteína de interés se recolecta en un tanque o depósito grande y se somete a una etapa/proceso de inactivación de los virus durante un período prolongado de tiempo con mezcla, que puede tomar de varias horas a un día o más, para lograr la inactivación completa de cualquier virus que pueda estar presente en el material de elución.

35     Se conocen en la técnica varias técnicas de inactivación de virus que incluyen temperatura, pH, radiación y exposición a ciertos agentes químicos.

Resumen

40     La presente invención proporciona métodos de inactivación de virus durante un proceso de purificación de proteínas, que tienen varias ventajas sobre los métodos que se usan actualmente en la industria durante la purificación de proteínas. Específicamente, los métodos descritos en la presente descripción obvian la necesidad de usar tanques o depósitos grandes para realizar la etapa de inactivación de los virus durante un proceso de purificación de proteínas; reducen el tiempo total requerido para la inactivación de los virus, así como también reducen el espacio físico general requerido para ejecutar la operación de inactivación de los virus durante un proceso de purificación de proteínas, lo que a su vez reduce el impacto general para todo el proceso de purificación.

50     En algunas modalidades, se proporciona un método para inactivar uno o más virus en una muestra en un proceso de purificación, donde el método comprende mezclar continuamente la muestra con uno o más agentes inactivantes de virus a medida que la muestra fluye de la primera operación unitaria a la segunda operación unitaria.

En algunas modalidades, la primera operación unitaria comprende la cromatografía de unión y elución y la segunda operación unitaria comprende un proceso de purificación de flujo continuo. Una operación unitaria ilustrativa de cromatografía de unión y elución incluye la cromatografía de afinidad a proteína A.

55     En algunas modalidades, el proceso de purificación de flujo continuo comprende dos o más matrices seleccionadas del grupo que consiste en carbón activado, medio de cromatografía de intercambio aniónico, medio de cromatografía de intercambio catiónico y medio de filtración de virus.

60     En algunas modalidades, la muestra comprende un eluato de proteína A que comprende una molécula objetivo. Las moléculas objetivo ilustrativas incluyen, por ejemplo, anticuerpos.

65     En algunas modalidades, la muestra se mezcla con uno o más agentes inactivantes de virus mediante el uso de uno o más mezcladores estáticos en línea. En otras modalidades, la muestra se mezcla con uno o más agentes inactivantes de virus mediante el uso de uno o más tanques de compensación. Cuando se usan mezcladores estáticos, el flujo de muestra está en el intervalo laminar.

En algunas modalidades, uno o más agentes inactivantes de virus se seleccionan del grupo que consiste en un ácido, una sal, un solvente y un detergente.

5 En algunas modalidades, se proporciona un método para inactivar uno o más virus en un eluato de proteína A, donde el método comprende mezclar el eluato con uno o más agentes inactivantes de virus mediante el uso de un mezclador estático en línea, en donde la inactivación completa de los virus se logra en menos de 10 minutos o menos de 5 minutos o menos de 2 minutos o menos de 1 minuto.

10 En otras modalidades, se proporciona un método para inactivar uno o más virus en un eluato de proteína A, donde el método comprende mezclar el eluato con uno o más agentes inactivantes de virus mediante el uso de un tanque de compensación, donde la inactivación completa de los virus se logra en menos de una hora o menos de 30 minutos.

15 En algunas modalidades, un método para inactivar uno o más virus comprende: (a) someter una muestra que comprende una proteína objetivo (por ejemplo, un anticuerpo) a un proceso de cromatografía de afinidad a proteína A, para obtener así un eluato; y (b) transferir continuamente el eluato a un mezclador estático en línea para mezclar uno o más agentes inactivantes de virus con el eluato durante un período de tiempo igual o inferior a 10 minutos, para inactivar así uno o más virus.

20 En algunas modalidades, el eluato de proteína A que se somete a los métodos de inactivación de virus descritos en la presente descripción se obtiene después de un proceso de cromatografía de afinidad a proteína A realizado en modo discontinuo. En otras modalidades, el proceso de cromatografía de afinidad a proteína A se realiza en un modo continuo. En algunas modalidades, el modo continuo comprende un proceso continuo de cromatografía de múltiples columnas.

25 En algunas modalidades, uno o más agentes inactivantes de virus, un ácido, se usa para realizar un cambio de solución.

30 En algunas modalidades, el eluato se transfiere continuamente a una etapa del proceso de purificación de flujo continuo después de la inactivación de los virus, en el que la salida del mezclador estático fluye directamente a una etapa de purificación de flujo continuo, que puede incluir el uso de dos o más matrices seleccionadas de carbón activado, medios de intercambio aniónico, medios de intercambio catiónico y medios de filtración de virus.

35 En otras modalidades, el eluato se almacena después de la inactivación de los virus durante un período prolongado de tiempo (por ejemplo, de 12 a 24 horas o durante la noche) en un tanque de almacenamiento o de depósito, antes de someterlo a la siguiente operación unitaria o etapa del proceso, por ejemplo, una etapa del proceso de purificación de flujo continuo o una etapa de cromatografía de unión y elución de intercambio catiónico.

40 En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los métodos de inactivación de los virus descritos en la presente descripción son parte de un proceso de purificación de proteínas más grande, que puede incluir varias etapas que incluyen, por ejemplo, cultivar células que expresan la proteína en un biorreactor; someter el cultivo celular a aclaramiento, que puede emplear uno o más de precipitación, centrifugación y/o filtración en profundidad; transferir el cultivo celular clarificado a una etapa de captura por cromatografía de unión y elución (por ejemplo, cromatografía de afinidad a proteína A); someter el eluato de proteína A a un método de inactivación de los virus, como se describe en la presente descripción; someter la salida de la inactivación de los virus a un proceso de purificación de flujo continuo, que emplea dos o más matrices seleccionadas de carbón activado, medios de cromatografía de intercambio aniónico, medios de cromatografía de intercambio catiónico y medios de filtración de virus; y formular la proteína en el flujo continuo de la etapa de purificación del flujo continuo mediante el uso de diafiltración/concentración y filtración estéril. Pueden encontrarse detalles adicionales de tales procesos, por ejemplo, en la solicitud copendiente que tiene el núm. de referencia. P12/107, presentada al mismo tiempo que la presente descripción.

50 En algunas modalidades, una muestra de fluido fluye continuamente a través de todo el proceso, como se describió anteriormente, de una etapa a la siguiente.

55 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una descripción esquemática de una configuración experimental para la inactivación de los virus mediante el uso de dos mezcladores estáticos en línea. La configuración que se muestra incluye: (a) una bomba peristáltica para la alimentación de la muestra, (b) dos bombas de jeringa para suministrar ácido y base, c) dos sondas de pH en línea y (d) dos mezcladores estáticos. Los regímenes de flujo están predeterminados en modo discontinuo en función de la cantidad de ácido/base necesaria para lograr el pH deseado. El tiempo de residencia para la inactivación de los virus se altera al tener tubos de diámetro y longitud apropiados después de cada mezclador estático y antes de la sonda de pH.

65

## Descripción detallada de la invención

La fabricación biofarmacéutica requiere la inactivación o eliminación de virus (provenientes de componentes derivados de animales, que incluyen las células de mamíferos) para la seguridad de los medicamentos y para cumplir con los estándares establecidos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). Los procesos típicos implican una serie de etapas de aclaramiento viral que proporcionan de forma acumulativa la protección necesaria.

Algunos procesos usados en la industria implican la titulación de la solución que contiene la proteína objetivo a un pH bajo para causar la destrucción de cualquier virus envuelto y componentes virales. Generalmente, la muestra que contiene la proteína objetivo debe retenerse en estas condiciones durante un período prolongado de tiempo, tanto porque se necesita tiempo para la inactivación de los virus como también, y lo que es más importante, para asegurar un mezclado homogéneo para una inactivación eficaz de los virus. Por lo tanto, en el caso de procesos a gran escala, la muestra que contiene la proteína objetivo debe incubarse durante un período prolongado de tiempo a un pH bajo para promover la inactivación eficaz de los virus, a menudo con mezclado. Ver, por ejemplo, Shukla y otros, J. Chromatography B., 848 (2007) 28-39, que describe la inactivación de los virus mediante la incubación de una muestra de proteína durante un período de tiempo adecuado a un pH bajo.

Las condiciones de pH se establecen como un equilibrio entre un valor de pH bajo suficiente para provocar la inactivación y un valor suficientemente alto para evitar la desnaturalización de la proteína objetivo. Además, la muestra debe exponerse durante un cierto período de tiempo para causar una reducción significativa, generalmente de 2 a 6 LRV en los valores de actividad de los virus (ver, por ejemplo, Miesegaes y otros, "Analysis of viral clearance unit operations for monoclonal antibodies", Biotechnology and Bioengineering, Vol. 106, pg 238-246 (2010)).

Los tres parámetros que se consideran importantes para un proceso de inactivación de los virus son el valor de pH, el tiempo de exposición y la temperatura, mientras se asume que existe un mezclado homogéneo. En el caso de procesos a gran escala, el mezclado plantea un desafío debido a los grandes volúmenes y parámetros adicionales, tal como la velocidad de mezclado y la transferencia de masa, que además se vuelven importantes.

En el caso de las proteínas que contiene región Fc (por ejemplo, anticuerpos monoclonales), la inactivación de los virus generalmente se realiza después de la elución de una etapa del proceso de cromatografía de unión y elución (por ejemplo, cromatografía de afinidad a proteína A o cromatografía de intercambio catiónico) porque el pH del material de elución es más cercano al pH conveniente para la inactivación de los virus. Por ejemplo, en los procesos usados en la industria hoy en día, el material de elución de la cromatografía con proteína A tiene típicamente un pH en el intervalo de 3,5 a 4,0 y el material de elución de la cromatografía de unión y elución de intercambio catiónico, típicamente, tiene un pH de aproximadamente 5,0.

En la mayoría de los procesos usados en la industria hoy en día, el material de elución que contiene la proteína objetivo se ajusta al pH deseado para la inactivación de los virus y se mantiene allí durante un cierto período de tiempo, al haberse demostrado que la combinación de pH y tiempo resulta en la inactivación de los virus. Los tiempos más largos son más efectivos para la inactivación de los virus, especialmente en el caso de un proceso a gran escala, sin embargo, se sabe además que los tiempos más largos causan daño a las proteínas. La exposición prolongada a un pH bajo puede provocar la precipitación y la formación de agregados, lo cual no es conveniente y, a menudo, requiere el uso de un filtro de profundidad y/o un filtro estéril para eliminar tales precipitados y agregados.

Adicionalmente a los problemas de calidad del producto inducidos por un pH bajo, la agitación en los tanques de depósito puede además causar agregación. El mezclado adecuado es esencial para homogeneizar los materiales de proteínas, y es especialmente importante durante la fabricación cuando las soluciones de proteínas deben tratarse con ácido/base o tampón para ajustar el pH y/o la conductividad (ver, por ejemplo, Vázquez-Rey y otros "Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes," Biotechnology and Bioengineering, Vol 108, Número 7, páginas 1494-1508 (2011)).

Varios estudios han demostrado que el cizallamiento debido a la agitación por sí sola puede no causar agregación de proteínas, pero puede facilitarse por agitación en presencia de una interfase gas-líquido (ver, por ejemplo, Mahler y otros, "Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis," J. Pharm. Sci. 98 (9): 2909-2934 (2009), Harrison y otros, "Stability of a single-chain Fv antibody fragment when exposed to a high shear environment combined with air-liquid interfaces," Biotechnol. Bioeng. 59: 517-519 (1998)). Por ejemplo, los estudios mencionados anteriormente han demostrado que la pérdida de actividad para un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla se produce al agitar la proteína en un recipiente lleno de forma incompleta. Además, estos estudios demostraron que la actividad proteica no se pierde en el caldo de fermentación en presencia de antiespumante en el caldo de fermentación. Sin embargo, la adición de antiespumante puede no ser la solución ideal, especialmente porque agregaría etapas de purificación adicionales y tiempo de procesamiento a un proceso de purificación.

La presente invención proporciona métodos nuevos y mejorados para la inactivación de los virus (también denominados "VI" en la presente descripción) durante un proceso de purificación de proteínas, lo que reduce el

tiempo total para la inactivación de los virus, el costo, así como también, el impacto físico general asociada con un proceso de purificación de proteínas.

5 Los métodos descritos en la presente descripción son capaces de lograr la inactivación de los virus de manera continua, lo que reduce significativamente el tiempo asociado con la inactivación de los virus en relación con la mayoría de los procesos convencionales y, a su vez, reduce el tiempo para el proceso de purificación general.

10 En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los métodos de acuerdo con la presente invención emplean uno o más mezcladores estáticos en línea para lograr la inactivación de los virus. En otras modalidades, los métodos de acuerdo con la presente invención emplean uno o más tanques de compensación para lograr la inactivación de los virus. Los métodos descritos en la presente descripción facilitan la ejecución de un proceso de purificación completo de manera continua, es decir, la muestra que contiene la proteína objetivo puede fluir continuamente de una etapa del proceso (u operación unitaria) a la siguiente etapa del proceso (u operación unitaria), sin la necesidad de detener el flujo de la muestra después de una etapa del proceso. Por consiguiente, en algunas modalidades de acuerdo con la presente invención, el material de elución de una etapa de proceso de cromatografía de unión y elución aguas arriba (por ejemplo, cromatografía de afinidad a proteína A o cromatografía de intercambio catiónico) puede someterse a inactivación de los virus en línea, mediante el uso de un mezclador estático y la muestra fluye continuamente a la siguiente etapa del proceso (por ejemplo, una etapa del proceso de purificación de flujo continuo). En consecuencia, a diferencia de los procesos convencionales, el material de elución no tiene que mezclarse o incubarse con un agente inactivante de virus durante un período prolongado de tiempo en un tanque de depósito o un recipiente antes de pasar a la siguiente etapa del proceso en el proceso de purificación.

25 Notablemente, se han descrito mezcladores estáticos para mezclar una muestra cuando está expuesta a radiación para inactivar patógenos (ver, por ejemplo, Publicación de Estados Unidos núm. 20040131497 y Publicación PCT núm. WO2002092806), o mezclar una muestra de sangre con un agente de inactivación de los virus mediante el uso de un mezclador estático (ver, por ejemplo, Publicación PCT núm. WO2004058046); sin embargo, no parece haber ninguna enseñanza o sugerencia en la técnica del uso de mezcladores estáticos para lograr la inactivación de los virus durante un proceso de purificación de proteínas, ya que la muestra fluye de una operación unitaria a otra.

30 Los métodos descritos en la presente descripción ofrecen varias ventajas sobre los procesos convencionales usados en la industria hoy en día, algunas de las cuales se describen a continuación.

Los métodos de inactivación de los virus descritos en la presente descripción pueden lograr un mezclado más eficiente de la muestra que contiene la proteína objetivo con un agente inactivante de los virus adecuado (por ejemplo, pH bajo) en menos tiempo que la mayoría de los procesos convencionales.

35 Debido a un tiempo de procesamiento más corto, se minimiza cualquier efecto adverso potencial sobre la calidad de la proteína objetivo. Por ejemplo, se ha demostrado que la exposición prolongada a condiciones de pH bajo puede afectar la calidad de la proteína objetivo, por ejemplo, al causar agregados de proteínas y otros cambios perjudiciales (ver, por ejemplo, Wang y otros, "Antibody structure, instability and formulation," J. Pharm. Sci. Vol. 96, pág. 1 a 26 (2007)). Al tener un tiempo de exposición más corto a condiciones que pueden ser potencialmente perjudiciales para la calidad del producto, puede minimizarse o evitarse cualquier daño a la calidad del producto.

40 La presente invención se basa, al menos en parte, en una observación sorprendente e inesperada de que incluso cuando el flujo de la muestra está en el intervalo de flujo laminar (por ejemplo, a un régimen de flujo lento), puede lograrse el mezclado eficiente, así como también, la inactivación eficaz de los virus. Específicamente, en el caso de algunos métodos descritos en la presente descripción, debido al uso de mezcladores estáticos en línea, el régimen de flujo de la muestra puede controlarse de manera que se sitúe el régimen de flujo en el intervalo de flujo laminar. Esto permite una inactivación más predecible en comparación con regímenes de flujo más altos, lo que contribuye a la turbulencia y conduce a una ventana de operación óptima más estrecha. Este resultado es inesperado ya que, en general, se requiere un régimen de flujo más alto para lograr un mezclado eficiente.

45 Un proceso que opera en el intervalo de flujo laminar puede controlarse mejor, ya que el mezclado no depende de la presencia de turbulencias. Por ejemplo, si las condiciones de flujo aguas arriba requieren una reducción en el régimen de flujo, el proceso de mezclado en línea puede salirse del régimen turbulento y perder algo de su eficiencia de mezclado. Sin embargo, si la eficiencia está dominada por el flujo laminar que existe en todo el intervalo de flujo, la eficiencia no se verá afectada.

50 Los métodos descritos en la presente descripción además ofrecen más control sobre los parámetros del proceso. En otras palabras, debido a que los métodos descritos en la presente descripción ofrecen más control sobre las condiciones de pH, ofrecen más control sobre todo el proceso y permiten un proceso más robusto en general.

55 Además de algunas de las ventajas anteriores, los métodos descritos en la presente descripción además resultan en un impacto físico más reducido del proceso, por ejemplo, al eliminar la necesidad de usar un tanque de depósito para la inactivación de los virus. En general, existe una demanda creciente de procesos de fabricación más flexibles que mejoren la eficiencia al reducir el impacto físico en general del proceso (es decir, el espacio en planta). Los

métodos descritos en la presente descripción pueden reducir el impacto en general de un proceso de purificación al reemplazar los grandes tanques de depósito que se usan típicamente para la inactivación de los virus, con mezcladores estáticos en línea o tanques de compensación, que son mucho más pequeños que los tanques de depósito.

Los métodos descritos en la presente descripción resultan en la eliminación de una operación unitaria completa en un proceso de purificación. Por ejemplo, como se discutió anteriormente, generalmente, la inactivación de los virus se realiza en un tanque de depósito grande. En la mayoría de los procesos convencionales, el eluato de la etapa de cromatografía de elución y unión aguas arriba se recoge en un tanque de depósito, a menudo sin ninguna capacidad de mezclado. Por consiguiente, la muestra (es decir, el material de elución) debe transferirse a un tanque de depósito adecuado con capacidad de mezclado. Después, se ajusta el pH al valor conveniente, seguido de una o dos horas de incubación o más, al valor de pH conveniente. Después del mezclado, el pH debe ajustarse nuevamente al pH que sea adecuado para la siguiente etapa del proceso, que suele ser un pH más alto que para la inactivación de los virus. Pueden usarse además una etapa de filtración (estéril) o dos (en profundidad y estéril) para eliminar cualquier turbidez de la muestra de inactivación de los virus antes de someter la muestra a la etapa siguiente. A menudo, cada una de estas etapas puede realizarse en el transcurso de un día y constituye una operación unitaria separada completa.

En algunas modalidades, una exposición más corta resulta en menos o ninguna turbidez, lo que elimina por tanto la necesidad de etapas de filtración posteriores. Los métodos descritos en la presente descripción simplifican significativamente los procesos de purificación convencionales al eliminar toda la operación unitaria que implica el uso de un tanque de depósito para la inactivación de los virus.

Los métodos descritos en la presente descripción ofrecen una escalabilidad más sencilla. Escalar un sistema de tanque de depósito discontinuo implica aumentar el tiempo de estabilización, así como también la eficiencia de mezclado que se basa en el sistema de mezclado subyacente (por ejemplo, un impulsor). Por ejemplo, si el volumen del tanque de depósito se incrementa en un factor de 10, entonces la eficiencia de mezclado debería incrementarse en un factor de 10 para mantener el mismo tiempo de mezclado. Nuevamente, el tiempo de mezclado debe minimizarse para proteger la proteína mientras se maximiza para lograr una cierta inactivación de LRV. En muchos casos, un mezclador no puede escalarse a una eficiencia de mezclado igual debido a las limitaciones en el tamaño del impulsor y las RPM disponibles del motor. La presente invención aumenta significativamente la eficiencia de mezclado y ofrece escalabilidad basada en un número adimensional llamado número de Reynolds (Re) que depende de las dimensiones de la tubería o tubo de conexión que incluye el mezclador estático en línea, la velocidad de flujo, la densidad del líquido y la viscosidad. El número de Reynolds se define como la relación entre la densidad X el diámetro del mezclador estático X el régimen de flujo y la viscosidad. La eficiencia de mezclado puede mejorarse al aumentar el número de elementos de mezclado del mezclador estático. Una mejor escalabilidad y un rendimiento más predictivo reducen los parámetros del proceso a solo el pH y el tiempo y eliminan la dependencia del éxito de la eficiencia del mezclado.

El mezclado estático en línea, como se describe en la presente descripción, permite modificar una solución en muy poco tiempo, al eliminar así gran parte del tiempo de estabilización. Esto permite que todo el proceso se comprima y resulte en un volumen de trabajo que es razonable para fines de escalado y diseño. Las propiedades del fluido de la muestra pueden cambiarse mediante introducción de un fluido de activación de los virus en la corriente principal de fluido a través de una válvula en T o un sistema colector. Una vez que el fluido está en la nueva condición deseada, el tiempo de residencia requerido al pH de inactivación puede garantizarse mediante aumento del tiempo de residencia en un tubo después del mezclador estático, ya sea por aumento de la longitud o del diámetro del tubo o por ambos. Al final del tiempo de residencia requerido, puede realizarse una modificación secundaria para devolver el fluido a una condición que sea conveniente para la proteína y la siguiente etapa del proceso.

Los métodos de inactivación de virus descritos en este documento facilitan un proceso de purificación que se ejecuta en un modo continuo, como se describe con más detalle en la presente descripción.

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

## I. Definiciones

El término "mezclador estático", como se usa en la presente descripción, se refiere a un dispositivo para mezclar dos materiales fluidos, típicamente líquidos (por ejemplo, una muestra que contiene una proteína objetivo o un eluato de una etapa de proceso de cromatografía de unión y elución). El dispositivo incluye típicamente elementos mezcladores (también denominados elementos no móviles) 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 del mezclador estático mezclan continuamente los materiales. El mezclado completo depende de muchas variables, que incluyen las propiedades de los fluidos, el diámetro interno del tubo, el número de elementos del mezclador y su diseño. En varias modalidades descritas en la presente descripción, se usa un mezclador estático en línea.

El término "en línea" u "operación en línea" se refiere a un proceso de mover una muestra líquida a través de un tubo o algún otro conducto sin almacenamiento en un recipiente. Por consiguiente, en algunas modalidades de acuerdo con la presente invención, se usa un mezclador estático en una "operación en línea" en un tubo a través del cual se mueve una muestra líquida que contiene una proteína objetivo de una etapa del proceso a otra.

El término "inactivación de virus" o "VI" se refiere al tratamiento de una muestra que contiene uno o más virus de tal manera que el uno o más virus ya no puedan replicarse o se vuelven inactivos. La inactivación de los virus puede lograrse por medios físicos, por ejemplo, calor, luz ultravioleta, vibración ultrasónica o mediante el uso de medios químicos, por ejemplo, cambio de pH o adición de un producto químico. La inactivación de los virus es típicamente una etapa del proceso que se usa durante la mayoría de los procesos de purificación de proteínas, especialmente en el caso de purificación de proteínas terapéuticas. En los métodos descritos en la presente descripción, la VI se realiza mediante el uso de uno o más mezcladores estáticos en línea o tanques de compensación. Se entiende que el hecho de no detectar uno o más virus en una muestra mediante el uso de ensayos estándar conocidos en la técnica y los descritos en la presente descripción, es indicativo de la inactivación completa del uno o más virus después del tratamiento de la muestra con uno o más agentes inactivantes de virus.

El término "agente inactivante de virus" o "agente de inactivación de virus" se refiere a cualquier medio físico o químico capaz de convertir uno o más virus en inactivos o incapaces de replicarse. Un agente inactivante de virus, como se usa en los métodos descritos en la presente descripción, puede incluir un cambio de condición de la solución (por ejemplo, pH, conductividad, temperatura, etc.) o la adición de un solvente/detergente, una sal, un polímero, una molécula pequeña, una molécula farmacéutica o cualquier otra entidad adecuada, etc., que interactúa con uno o más virus en una muestra o un medio físico (por ejemplo, exposición a luz ultravioleta, vibración, etc.), de manera que la exposición al agente inactivante de virus hace uno o más virus inactivos o incapaces de replicarse. En una modalidad particular, un agente de inactivación de virus es un cambio de pH, donde el agente inactivante de virus se mezcla con una muestra que contiene una molécula objetivo (por ejemplo, un eluato de una etapa de cromatografía de unión y elución con proteína A) mediante el uso de un mezclador estático en línea o un tanque de compensación.

El término "eliminación de virus" se refiere al tratamiento de una solución que contiene virus de manera que los virus se eliminan de la solución. La eliminación de los virus puede realizarse mediante tamizado (por ejemplo, mediante el uso de una membrana de nanofiltración con un tamaño de poro apropiado) o mediante adsorción (por ejemplo, mediante el uso de un dispositivo cromatográfico con un medio de carga opuesta a la del virus).

El término "flujo turbulento" se refiere al movimiento de un fluido en el que las subcorrientes en el fluido muestran turbulencias, con movimiento en patrones irregulares, mientras que el flujo en general es en una dirección. El flujo turbulento es común en fluidos no viscosos que se mueven a altas velocidades.

El término "flujo laminar" se refiere al movimiento ordenado y suave de un fluido, en el que no hay turbulencia, y cualquier subcorriente dada se mueve más o menos en paralelo con cualquier otra subcorriente cercana. El flujo laminar es común en fluidos viscosos, especialmente aquellos que se mueven a bajas velocidades. En algunas modalidades de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción, se emplea flujo laminar.

El término "tanque de depósito" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier contenedor, recipiente, depósito, tanque o bolsa, que se usa 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 contener o almacenar o manipular las condiciones de la solución de todo el volumen de salida de una etapa del proceso. En varias modalidades de acuerdo con la presente invención, los métodos descritos en la presente descripción obvian la necesidad de usar uno o más tanques de depósito.

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción pueden usar uno o más tanques de compensación.

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 etapas del proceso; donde la salida de una etapa del proceso fluye a través del tanque de compensación a la etapa siguiente en un proceso de purificación. En consecuencia, un tanque de compensación es diferente de un tanque de depósito, en el sentido de que no está destinado a retener o recoger todo el volumen de salida de una etapa del proceso; pero en su lugar permite un flujo continuo de salida de una etapa del proceso a la siguiente. En algunas modalidades, el volumen de un tanque de compensación usado entre dos etapas del proceso en un método descrito en la presente descripción, no es más de 25 % del volumen total de la 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 la salida de una etapa del proceso. En algunas otras modalidades, el volumen de un tanque de compensación es menos de 35 %, o menos de 30 %, o menos de 25 %, o menos de 20 %, o menos de 15 %, o menos de 10 % el volumen total de un cultivo celular en un biorreactor, que constituye el material de partida a partir del cual se va a purificar una molécula objetivo. En algunas modalidades, la inactivación de los virus, como se describe en la presente descripción, se logra a través de un tanque de compensación, donde se emplea un tanque

de compensación para mezclar un agente de inactivación de virus adecuado con una muestra que contiene una proteína objetivo (por ejemplo, el eluato de una etapa de cromatografía de unión y de elución con proteína A).

El término "proceso conectado" se refiere a un proceso para purificar una molécula objetivo, donde el proceso comprende dos o más etapas del proceso (u operaciones unitarias), que están en comunicación directa de fluido entre sí, de modo que el material fluido fluya continuamente a través de la etapa del proceso (u operación unitaria) en el proceso y esté en contacto simultáneo con dos o más etapas del proceso durante el funcionamiento normal del proceso. Se entiende que a veces, al menos una etapa del proceso en el proceso (u operación unitaria) puede aislarse temporalmente de las otras etapas del proceso (u operaciones unitarias) mediante una barrera, tal como una válvula en la posición cerrada. Este aislamiento temporal de las operaciones unitarias individuales puede ser necesario, por ejemplo, durante el inicio o apagado del proceso o durante la eliminación/reemplazo de las operaciones unitarias individuales.

Los términos "proteína A" y "ProA" se usan indistintamente en la presente descripción y abarcan la proteína A recuperada de una fuente nativa de esta, la proteína A producida sintéticamente (por ejemplo, mediante síntesis de péptidos o mediante técnicas recombinantes), y variantes de esta que retienen la capacidad de unirse a proteínas que tienen una región  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ , tal como una región Fc. La proteína A puede adquirirse comercialmente de Repligen, Pharmacia y Fermatech. La proteína A generalmente se inmoviliza en un material de soporte en fase sólida. El término "ProA" se refiere además a una columna o resina de cromatografía de afinidad que contiene una matriz de soporte sólido cromatográfico a la que se une covalentemente la proteína A. En una modalidad particular, la proteína A usada en los métodos de acuerdo con la presente invención es una forma alcalina estable de proteína A. En una modalidad particular, la proteína A incluye uno o más dominios de proteína A o variantes funcionales o fragmentos de estos, como se describió en las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. US 12/653,888, presentada el 18 de diciembre de 2009 y 13/489,999 presentada el 6 de junio de 2012, que se refieren a formas multiméricas de tipo silvestre de dominios B, Z o C o variantes multiméricas de uno o más dominios de la proteína A (por ejemplo, pentámeros de dominio B, Z o C) con cada dominio que tiene un truncamiento de 3 o 4 amino ácidos del extremo N, donde un dominio puede incluir adicionalmente una mutación para reducir o eliminar la unión de Fab.

Un derivado, fragmento o variante funcional de la proteína A usada en los métodos de acuerdo con la presente invención 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 IgG2a de ratón o IgG1 humana. Una interacción obtenida con dicho valor para la constante de unión se denomina "unión de alta afinidad" en el presente contexto. Preferentemente, tal derivado funcional o variante de la proteína A comprende al menos parte de un dominio funcional de unión a IgG de la proteína A de tipo silvestre, seleccionada de los dominios naturales E, D, A, B, C o mutantes modificados por ingeniería genética de esta que han retenido la funcionalidad de unión a IgG.

En varias modalidades de acuerdo con la presente invención, la proteína A se inmoviliza sobre un soporte sólido.

Los términos "soporte sólido", "fase sólida", "matriz" y "matriz de cromatografía", como se usan indistintamente en la presente descripción, generalmente se refieren a cualquier tipo de absorbente particulado, resina u otra fase sólida (por ejemplo, una membrana, no tejido, monolito, etc.) que en un proceso de separación actúa como adsorbente para separar una molécula objetivo (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc como una inmunoglobulina) de otras moléculas presentes en una mezcla. A menudo, la molécula objetivo 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 la matriz bajo la influencia de una fase móvil. La matriz que consiste en partículas de resina puede colocarse en columnas o cartuchos. Los ejemplos de materiales para formar la matriz incluyen polisacáridos (tales como agarosa y celulosa); y otras matrices mecánicamente estables tales como sílice (por ejemplo, vidrio de poro controlado), poli(estirendivinil)benceno, poliacrilamida, partículas cerámicas y derivados de cualquiera de los anteriores. Típicamente, la matriz porta uno o más tipos de ligandos. Sin embargo, existen casos en los que la matriz por sí sola es el medio cromatográfico (por ejemplo, carbón activado, hidroxipatita, sílice, etc.)

Un "ligando" es un grupo funcional que se une a la matriz cromatográfica y que determina las propiedades de unión de la matriz. Los ejemplos de "ligandos" incluyen grupos de intercambio iónico, grupos de interacciones hidrófobas, grupos de interacciones hidrófilas, grupos de interacciones tiofílicas, grupos de afinidad por metales, grupos de afinidad, grupos de bioafinidad y grupos de modo mixto (combinaciones de los mencionados anteriormente). Algunos ligandos que pueden usarse en la presente descripción incluyen 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  $\text{N}_2\text{N}$  dietilamino o DEAE; grupos de interacciones hidrófobas, tales como fenilo, butilo, propilo, hexilo; y grupos de afinidad, tales como la proteína A, la proteína G y la proteína L. En varias modalidades de acuerdo con la invención, el ligando es la proteína A o una variante o fragmento de esta.

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



El término "cromatografía de afinidad" se refiere a una técnica de separación de proteínas en la que una proteína objetivo (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc de interés o un anticuerpo) se une específicamente a un ligando (por ejemplo, proteína A), que normalmente se inmoviliza sobre un sólido soporte (el ligando inmovilizado sobre el soporte sólido se denomina en la presente descripción "matriz cromatográfica"). La proteína objetivo 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 proteína objetivo al ligando inmovilizado permite que las impurezas que incluyen proteínas contaminantes o impurezas proteicas (por ejemplo, HCP) pasen a través de la matriz cromatográfica mientras la proteína objetivo permanece unida específicamente al ligando inmovilizado sobre el material de soporte sólido; sin embargo, típicamente se observa alguna unión no específica de las proteínas contaminantes a la matriz. La matriz de cromatografía se lava típicamente una o más veces con un tampón de lavado adecuado, para eliminar las proteínas unidas no específicamente (por ejemplo, HCP) y otras impurezas antes de eluir la proteína unida de la matriz. La proteína de interés unida específicamente se eluye posteriormente de la matriz mediante el uso de un tampón de elución adecuado que facilita la separación de la proteína de interés de la matriz. En modalidades de acuerdo con la presente invención, se eliminan una o más etapas de lavado intermedias de dicho proceso, sin disminuir la pureza de la proteína objetivo eluida. En otras palabras, en algunas modalidades de acuerdo con la presente invención, se permite que una proteína de interés se una a una matriz de cromatografía que contiene proteína A y posteriormente se eluye, sin necesidad de una o más etapas de lavado intermedias; sin embargo, la pureza de la proteína de interés en el material de elución de proteína A no se ve afectada. En otras modalidades, el número de etapas de lavado intermedios se reduce en comparación con un proceso que normalmente usaría un cierto número de etapas de lavado para lograr un cierto nivel de pureza de la proteína de interés en el material de elución de proteína A. En diversas modalidades de acuerdo con la presente invención, el nivel de proteínas de la célula huésped se reduce en el material de elución de proteína A, a pesar de la eliminación o reducción del número de etapas de lavado intermedias.

Los términos "intercambio iónico" y "cromatografía de intercambio iónico", como se usan indistintamente en la presente descripción, se refieren al proceso cromatográfico en el cual un soluto o analito de interés en una mezcla, interactúa con un compuesto cargado unido (tal como por unión covalente) a un material de intercambio iónico en fase sólida, de modo que el soluto o analito de interés interactúe de manera no específica con el compuesto cargado más o menos en comparación con 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. 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 objetivo (por ejemplo, una proteína objetivo que contiene una región Fc) seguida de elución (cromatografía de intercambio catiónico de unión y elución o "CIEX") o puede unir predominantemente las impurezas mientras que la molécula objetivo "fluye continuamente" de la columna (cromatografía de intercambio catiónico de flujo continuo o FT-CIEX). En el caso de la cromatografía de intercambio aniónico, el material de la fase sólida puede unir la molécula objetivo (por ejemplo, una proteína objetivo que contiene una región Fc) seguida de elución o puede unir predominantemente las impurezas mientras la molécula objetivo "fluye continuamente" a través de la columna.

El término "matriz de intercambio iónico" se refiere a una matriz de cromatografía que está cargada negativamente (es decir, una resina de intercambio catiónico) o cargada positivamente (es decir, una resina de intercambio aniónico). La carga puede proporcionarse al unir uno o más ligandos cargados a la 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).

El término "matriz de intercambio catiónico" se refiere a una matriz que está cargada negativamente y que tiene cationes libres para el intercambio con cationes en una solución acuosa en contacto con la matriz. Un ligando cargado negativamente unido a la fase sólida para formar la matriz de intercambio catiónico puede, por ejemplo, ser un carboxilato o sulfonato. Las resinas de intercambio catiónico disponibles comercialmente incluyen carboximetilcelulosa, sulfopropilo (SP) inmovilizado en agarosa (por ejemplo, SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ o SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™, de GE Healthcare) y sulfonilo inmovilizado en agarosa (por ejemplo, S-SEPHAROSE FAST FLOW™ de GE Healthcare). Ejemplos adicionales incluyen Fractogel® EMD SO<sub>3</sub>, Fractogel® EMD SE Highcap, Eshmuno® S y Fractogel® EMD COO (EMD Millipore).

Una "matriz de intercambio iónico de modo mixto" o "matriz de modo mixto" se refiere a una matriz de cromatografía que se modifica covalentemente con porciones catiónicas y/o aniónicas e hidrófobas. Una resina 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 porciones de intercambio catiónico e hidrófobas. Los materiales de intercambio catiónico de modo mixto adecuados son Capto® MMC (GE Healthcare) y Eshmuno® HCX (Merck Millipore). Los materiales de intercambio aniónico de modo mixto tienen típicamente porciones hidrófobas y de intercambio aniónico. Los materiales de intercambio aniónico de modo mixto adecuados son Capto® Adhere (GE Healthcare).

El término "matriz de intercambio aniónico" se usa en la presente descripción para referirse a una matriz de cromatografía que está cargada positivamente, por ejemplo, que tiene uno o más ligandos cargados positivamente, tales como grupos amino cuaternarios, unidos a esta. Las resinas de intercambio aniónico disponibles comercialmente incluyen celulosa DEAE, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ (GE Healthcare). Ejemplos adicionales incluyen Fractogel® EMD TMAE, Fractogel® EMD TMAE highcap, Eshmuno® Q y Fractogel® EMD DEAE (Merck Millipore).

Los términos "proceso de flujo continuo", "modo de flujo continuo" y "cromatografía de flujo continuo", tal como se usan indistintamente en la presente descripción, se refieren a una técnica de separación de productos en la cual al menos un producto de interés contenido en una preparación biofarmacéutica junto con una o más impurezas, está destinado a fluir a través de un material, que usualmente une a la una o más impurezas, donde el producto de interés usualmente fluye continuamente.

Los términos "proceso de unión y elución", "modo de unión y elución" y "cromatografía de unión y elución", como se usan indistintamente en la presente descripción, se refieren a una técnica de separación de productos en la que al menos un producto de interés está contenido en una preparación biofarmacéutica junto con una o más impurezas se ponen en contacto con un soporte sólido en condiciones que facilitan la unión del producto de interés al soporte sólido. El producto de interés posteriormente se eluye del soporte sólido. En algunas modalidades de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción, un soporte sólido que tiene la proteína A unida al soporte sólido se pone en contacto con una muestra que contiene un producto de interés y una o más impurezas en condiciones adecuadas que facilitan la unión del producto de interés a la proteína A en el soporte sólido, donde no se espera que la una o más impurezas se unan específicamente al soporte sólido. El producto de interés se eluye posteriormente del soporte sólido que contiene la proteína A, en un intento de separar el producto de interés de la una o más impurezas. En los métodos descritos en la presente descripción, después de la elución, el material de elución de la proteína A se somete a inactivación de los virus mediante el uso de uno o más mezcladores estáticos o un tanque de compensación, como se describe en la presente descripción, donde la inactivación de los virus puede lograrse en cuestión de minutos a aproximadamente una hora, en comparación con los procesos convencionales en los que la inactivación de los virus suele tardar varias horas.

El término "contaminante", "impureza" o "restos", como se usa indistintamente en la presente descripción, se refiere a cualquier molécula extraña u objetable, que incluye una macromolécula biológica tal como un ADN, un ARN, una o más proteínas de células huésped, endotoxinas, lípidos, agregados y uno o más aditivos que pueden estar presentes en una muestra que contiene el producto de interés que se separa de una o más de las moléculas extrañas u objetables. Además, tal contaminante puede incluir cualquier reactivo que se use en una etapa que pueda ocurrir antes del proceso de separación.

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"). La HCP o CHOP generalmente está presente como una impureza en un medio de cultivo celular o lisado (por ejemplo, un fluido de cultivo celular cosechado ("HCCF")) que comprende una proteína de interés tal como un anticuerpo o proteína que contiene Fc expresada en una célula CHO). La cantidad de CHOP presente en una mezcla que comprende una proteína de interés proporciona una medida del grado de pureza de la proteína de interés. La HCP o CHOP incluye 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 proteína de interés en la mezcla. Se entiende que cuando la célula huésped es otro tipo de célula, por ejemplo, una célula de mamífero diferente de CHO, una *E. coli*, una levadura, una célula de insecto o una célula vegetal, HCP se refiere a las proteínas, distintas de la proteína objetivo, encontradas en un lisado de la célula huésped.

El término "partes por millón" o "ppm" se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a una medida de pureza de una proteína objetivo purificada mediante un método de la invención. Las unidades ppm se refieren a la cantidad de HCP o CHOP en nanogramos/mililitro por proteína de interés en miligramos/mililitro (es decir, ppm de CHOP = (ng/mL de CHOP)/(mg/mL de proteína de interés), donde las proteínas están en solución).

Los términos "aclerar", "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, para reducir así la turbidez, de una solución que contiene la molécula objetivo, 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 actual, la centrifugación típicamente está seguida por filtros de profundidad destinados a eliminar las impurezas insolubles, que pueden no haberse eliminado por 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 a estímulos, 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 obvian la necesidad de centrifugación.

5 Los términos "purificar", "separar" o "aislar", como se usan indistintamente en la presente descripción, se refieren al aumento del grado de pureza de un polipéptido o proteína de interés o una proteína objetivo de una composición o muestra que comprende la proteína de interés y una o más impurezas. Típicamente, el grado de pureza de la proteína objetivo se aumenta al eliminar (total o parcialmente) al menos una impureza de la composición. Una "etapa de purificación" puede ser parte de un proceso de purificación global que resulta en una composición o muestra

10 "homogénea", que se usa en la presente descripción para referirse a una composición o muestra que comprende menos de 100 ppm de HCP en una composición que comprende la proteína de interés, alternativamente menos de 90 ppm, menos de 80 ppm, menos de 70 ppm, menos de 60 ppm, menos de 50 ppm, menos de 40 ppm, menos de 30 ppm, menos de 20 ppm, menos de 10 ppm, menos de 5 ppm o menos de 3 ppm de HCP.

15 En algunas modalidades de acuerdo con la presente invención, el producto de interés es una inmunoglobulina.

Los términos "inmunoglobulina", "Ig" o "anticuerpo" (usados indistintamente en la presente descripción) se refieren a una proteína que tiene una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas que consta de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, dichas cadenas que se estabilizan, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro intercatenarios, que tienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "inmunoglobulina de cadena sencilla" o "anticuerpo de cadena sencilla" (usado indistintamente en la presente descripción) se refiere a una proteína que tiene una estructura de dos cadenas polipeptídicas que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera, dichas cadenas que se estabilizan, por ejemplo, mediante enlaces peptídicos intercatenarios, que tienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de

20 cadena pesada o ligera que comprende lazos peptídicos (por ejemplo, que comprenden de 3 a 4 lazos peptídicos) estabilizados, por ejemplo, mediante una lámina  $\beta$  plegada y/o un enlace disulfuro intracatenario. Los dominios se denominan en la presente descripción adicionalmente como "constantes" o "variables", basándose en la falta relativa de variación de secuencias dentro de los dominios de varios miembros de la clase en el caso de un dominio "constante", o en la variación significativa dentro de los dominios de varios miembros de la clase en el caso de un dominio "variable". Los "dominios" de los anticuerpos o polipéptidos a menudo se denominan indistintamente en la técnica como "regiones" de los anticuerpos o polipéptidos. Los dominios "constantes" de las cadenas ligeras de los anticuerpos se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena ligera", "dominios constantes de la cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de las cadenas pesadas de los anticuerpos se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena pesada", "dominios constantes de la

25 cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" de las cadenas ligeras de los anticuerpos se denominan indistintamente "regiones variables de la cadena ligera", "dominios variables de la cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" de las cadenas pesadas de los anticuerpos se denominan indistintamente "regiones variables de la cadena pesada", "dominios variables de la cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

Las inmunoglobulinas o 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. 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 mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos, además, pueden obtenerse por medios recombinantes. Los fragmentos ilustrativos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc y/o Fv.

45

El término "fragmento de unión al antígeno" se refiere a una porción polipeptídica de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une a un antígeno o compete con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se derivaron) por la unión al antígeno (es decir, unión específica). Los fragmentos de unión pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen anticuerpos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, monocatenarios y monocatenarios.

50

La proteína de interés que se purifica de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción es una que comprende una región C<sub>H</sub>2/C<sub>H</sub>3 y, por lo tanto, es susceptible de purificación mediante cromatografía con proteína A. El término "región C<sub>H</sub>2/C<sub>H</sub>3" cuando se usa en la presente descripción se refiere a aquellos residuos de aminoácidos en la región Fc de una molécula de inmunoglobulina que interactúan con la proteína A. Ejemplos de región C<sub>H</sub>2/C<sub>H</sub>3 o proteínas que contienen región Fc incluyen anticuerpos, inmunoconjugados y proteínas de fusión que comprenden una proteína de interés fusionada o conjugada con una región C<sub>H</sub>2/C<sub>H</sub>3 o una región Fc.

60

En una modalidad particular, los métodos de acuerdo con la invención reivindicada se usan para purificar un fragmento de un anticuerpo que es un fragmento que contiene la región Fc.

El término "región Fc" y "proteína que contiene una región Fc" significa que la proteína contiene regiones o dominios constantes de cadena pesada y/o ligera (regiones CH y CL como se definió previamente) de una inmunoglobulina.

65

Las proteínas que contienen una "región Fc" pueden poseer funciones efectoras de un dominio constante de inmunoglobulina. Una "región Fc", tal como las regiones C<sub>H</sub>2/C<sub>H</sub>3, puede unirse selectivamente a ligandos de afinidad tales como la proteína A o variantes funcionales de esta. En algunas modalidades, una proteína que contiene una región Fc se une específicamente a la proteína A o un derivado, variante o fragmento funcional de esta. En otras modalidades, una proteína que contiene una región Fc se une específicamente a la Proteína G o la Proteína L, o derivados, variantes o fragmentos funcionales de esta.

Generalmente, una inmunoglobulina o anticuerpo se dirige contra un "antígeno" de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece de una enfermedad o trastorno puede resultar en un beneficio terapéutico en ese mamífero.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, los que se dirigen frente a un solo sitio antigénico. Adicionalmente, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen típicamente diferentes anticuerpos que se dirigen frente a diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un único determinante del antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden producirse mediante el método de hibridomas que se describe por primera vez por Kohler y otros, *Nature* 256:495 (1975), o puede producirse mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse además de bibliotecas de anticuerpos de fagos mediante el uso de las técnicas que se describen en Clackson y otros, *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks y otros, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991).

Los anticuerpos monoclonales pueden incluir además anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos núm. 4,816,567; y Morrison y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

El término "región hipervariable", cuando se usa en la presente descripción, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (es decir, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda Md. (1991)) y/o los residuos de un "lazo hipervariable" (es decir, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los residuos "estructurales" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se define en la presente descripción.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los residuos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tales como el ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se producen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los lazos hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, ver Jones y otros, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann y otros, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)).

Un "tampón" es una solución que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. Varios 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 que controlarán el pH en este intervalo

incluyen tampones MES, MOPS, MOPSO, Tris, HEPES, fosfato, acetato, citrato, succinato y amonio, así como combinaciones de estos.

El término "solución", "composición" o "muestra", como se usan en la presente descripción, se refiere a una mezcla de una molécula de interés o proteína objetivo (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc tal como un anticuerpo) y una o más impurezas. En algunas modalidades, la muestra se somete a una etapa de clarificación y una etapa de cromatografía de afinidad a proteína A antes de someterse a los métodos de inactivación de virus descritos en el presente documento. En algunas modalidades, la muestra comprende alimento de cultivo celular, por ejemplo, alimento de un cultivo de células CHO, que se somete a clarificación y una etapa de cromatografía con proteína A antes de la inactivación de los virus.

El término "sistemas de expresión de no mamíferos", como se usa en la presente descripción, se refiere a todas las células u organismos huésped que se emplean para generar proteínas terapéuticas, donde las células u organismos huésped son de origen no mamífero. Ejemplos de sistemas de expresión de no mamíferos son *E. coli* y *Pichia pastoris*.

El término "eluato" o "material de elución", como se usa en la presente descripción, se refiere a una solución que contiene una molécula de interés obtenida mediante elución, por ejemplo, después de la cromatografía de unión y elución (por ejemplo, mediante el uso de una matriz de cromatografía de afinidad a proteína A). El eluato puede someterse a una o más etapas de purificación adicionales. En algunas modalidades de acuerdo con la presente invención, se obtiene un material de elución, que contiene una proteína objetivo, por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc, en donde el material de elución se somete a inactivación de los virus, como se describe en la presente descripción.

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 tamponador y/o la concentración de una sal (por ejemplo, NaCl o KCl) en la solución puede alterarse con el fin de alcanzar la conductividad que se desea. En algunas modalidades, la concentración de sales de varios tampones se modifica para alcanzar la conductividad que se desea.

El término "pI" o "punto isoeléctrico" de un polipéptido se refiere al pH al cual la carga positiva del polipéptido equilibra su carga negativa. El pI puede calcularse a partir de la carga neta de los residuos de aminoácidos o residuos de ácido siálico de los carbohidratos unidos del polipéptido, o puede determinarse mediante focalización isoeléctrica.

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 cierto resultado en un proceso de purificación. Los ejemplos de etapas del proceso u operaciones unitarias que pueden emplearse en un proceso de purificación incluyen clarificación, cromatografía de unión y elución, inactivación de virus, purificación de flujo continuo y formulación. Se entiende que cada una de las etapas del proceso u operaciones unitarias puede emplear más de una etapa o método o dispositivo para lograr el resultado deseado de esa etapa del proceso u operación unitaria.

El término "proceso continuo", como se usa en la presente descripción, se refiere a un proceso para purificar una molécula objetivo, que incluye dos o más etapas del proceso (u operaciones unitarias), de modo que la salida de una etapa de un proceso fluya directamente a la siguiente etapa del proceso en el proceso, sin interrupción, y donde dos o más etapas del proceso pueden realizarse simultáneamente durante al menos una porción de su duración. En otras palabras, en el caso de un proceso continuo, no es necesario completar una etapa del proceso antes de que comience la siguiente etapa del proceso, sino que una porción de la muestra siempre está en movimiento a través de las etapas del proceso.

En algunas modalidades, las diferentes etapas del proceso están conectadas para funcionar de manera continua. En algunas modalidades, un método de inactivación de virus, como se describe en la presente descripción, constituye una etapa del proceso en un proceso de purificación continuo, donde una muestra fluye continuamente desde una etapa de cromatografía de afinidad a proteína A, a la etapa de inactivación de virus a la siguiente etapa del proceso, que es típicamente una etapa de proceso de purificación de flujo continuo.

En algunas modalidades, la etapa del proceso de inactivación de los virus se realiza de forma continua, es decir, el eluato de la etapa previa de cromatografía de unión y elución (es decir, cromatografía de afinidad a proteína A) fluye continuamente a la etapa de inactivación de los virus, que emplea uno o más mezcladores estáticos y/o tanques de compensación, después de lo cual el eluato con virus inactivados puede recogerse en un recipiente de almacenamiento hasta que se realiza la siguiente etapa del proceso.

## II. Agentes inactivantes de virus ilustrativos

La inactivación viral hace que los virus se vuelvan inactivos o incapaces de replicarse o infectar, lo cual es importante, especialmente en el caso de que la molécula objetivo esté destinada a un uso terapéutico. De acuerdo con esto, la inactivación de los virus se usa típicamente durante un proceso de purificación de proteínas, especialmente cuando la proteína está 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 pueden desnaturalizar el virus por completo. 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 solvente/detergente (por ejemplo, con Triton X 100); pasteurización (calentamiento); inactivación por pH ácido; e inactivación ultravioleta (UV). Es posible además combinar dos o más de estos procesos; por ejemplo, realizar una inactivación con pH ácido a temperatura elevada.

Se conocen en la técnica varios agentes inactivantes de virus para productos biotecnológicos. Ver, por ejemplo, Gail Sofer, "Virus Inactivation in the 1990s - and into the 21st Century, Parte 4, Culture Media, Biotechnology Products, and Vaccines," Biopharm International, enero de 2003, pp. 50-57), algunos de los cuales se describen a continuación.

Se ha demostrado que un pH bajo inactiva el virus de la leucemia murina xenotrópica (XMuLV). En un estudio, se encontró que el pH 3,5-4,0 era efectivo a 18-26 °C, y se observó muy poca diferencia en la cinética de inactivación para pH 3,7 hasta pH 4,1. Sin embargo, a 2-8 °C, la inactivación con pH 4,1 fue más lenta y requirió hasta una hora, en comparación con aproximadamente 30 minutos para pH 3,7. Además, se observó variabilidad para las diferentes moléculas objetivo que se purificaron. Por ejemplo, el tiempo de inactivación usado con una molécula objetivo fue de 60 minutos, mientras que para otra fue de 120 minutos, y además, en el caso de una molécula objetivo, el virus XMuLV no se inactivó completamente incluso después de 120 minutos. La concentración de proteínas afectó además a la cinética de inactivación. Solo en tampón, XMuLV se inactivó en 120 minutos; la adición de proteínas evitó la inactivación completa con el mismo pH, temperatura y tiempo de exposición. La fuerza iónica de la solución inactivante pareció mitigar el efecto de aumentar la concentración de proteínas.

En otro estudio, se investigó el pH bajo para la inactivación de los virus XMuLV y el virus de la pseudorrabia (PRV) en el caso de ocho anticuerpos monoclonales (MS) diferentes producidos en líneas celulares de ratón Sp2/0 o NS0. Los valores de pH usados variaron entre 3,14 y 3,62, lo que resultó en valores de LRV que variaron entre 5 y 6 (es decir, no puede medirse el virus en la muestra). Estos datos se usan para respaldar enfoques genéricos de inactivación de virus. Un estudio diferente de 13 productos, en su mayoría MAb, pero no todos, ilustró la capacidad del pH 3,6-4,0 para inactivar varios virus diferentes en cinco a 60 minutos.

Se ha descubierto que el caprilato inactiva los virus envueltos en lípidos en los procesos de producción de MAb. El caldo de recolección de cultivo celular que contenía un conjugado de exotoxina A de *Pseudomonas* -anticuerpo monoclonal y una IgM monoclonal de *Pseudomonas* se enriqueció con virus. Los virus del virus del herpes simple 1 (HSV-1) y del virus de la estomatitis vesicular (VSV) se inactivaron completamente a 20 °C en menos de 60 minutos. Sin embargo, a 5 °C solo se mostró una inactivación parcial de VSV después de 120 minutos. Una forma no ionizada del caprilato se mantiene en un amplio intervalo de pH y la forma no ionizada es eficaz en la inactivación viral a concentraciones entre 0,001 y 0,07 % en peso. El VSV y el virus vaccinia se inactivaron más lentamente que el HSV-1 a pH 6,3.

Se han usado además detergentes como agente inactivante de virus. Triton X-100 (0,5 %, 4 °C) inactivó completamente los virus del virus respiratorio sincitial (RSV) y del virus de la leucemia murina Friend (FrMuLV) en cuatro horas sin influir en la capacidad de unión de varios MAb. Los valores de reducción de log<sub>10</sub> fueron > 3,8 para FrMuLV y > 5,4 para RSV. Otros datos han demostrado que MuLV no fue inactivado por 0,1 a 1 % de Tween.

Los solventes/detergentes (S/D) se usan comúnmente para la inactivación de virus con proteínas plasmáticas. Los S / D se usan además para la inactivación de virus envueltos durante la producción de proteínas recombinantes y MAb. Por ejemplo, durante la producción de factor VIII recombinante con el dominio B eliminado, se usa S/D para la inactivación de los virus. Aunque no pueden asociarse ningún virus con la línea celular CHO usada para la producción, puede añadirse S/D después de una etapa de intercambio catiónico. Las concentraciones de 0,3 % de TNBP y 1 % de Triton X-100 son el objetivo durante al menos 30 minutos. Se ha demostrado que el tratamiento con S/D inactiva completa y rápidamente todos los virus envueltos probados, que incluyen el virus parainfluenza-3 (PI-3), XMuLV, el virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa (IBR) y el virus de la fiebre catarral maligna (MCF). (Ver, Sofer y otros, *Id.*)

Se ha propuesto la beta-propiolactona para la inactivación viral en vacunas de ADN desnudo. Se encontró que para un tratamiento de 16 horas a 4 °C, la concentración inicial de β-propiolactona no debería exceder el 0,25 % para evitar la pérdida de expresión génica.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente invención, la inactivación de virus emplea la exposición de la muestra que contiene la proteína objetivo a un pH ácido o bajo. Por consiguiente, en algunas modalidades descritas en la presente descripción, la inactivación de los virus emplea la exposición de la salida o eluato de la etapa de cromatografía de unión y elución, que está aguas arriba de la inactivación de los virus, a pH ácido en línea mediante el uso de un mezclador estático. El pH usado para la inactivación de los virus es típicamente inferior a 5,0 o entre 3,0 y 4,0. En algunas modalidades, el pH es 3,6 o menor. El período de tiempo usado para la inactivación de los virus, cuando se usa un tanque mezclador estático en línea, es de 10 minutos o menos, o 5 minutos o menos, o 2 minutos o menos, o 1 minuto o menos. En otras modalidades, se usa un tanque de compensación entre la etapa de cromatografía de unión y elución y la etapa del proceso de flujo continuo. El período de tiempo para la inactivación de los virus, cuando se usa un tanque de compensación, es típicamente de 1 hora o menos, o 30 minutos o menos. En caso de que se utilicen mezcladores estáticos en línea o tanques de compensación, la inactivación de los virus permite que el proceso se ejecute de forma continua, en lugar de tener que recolectar la muestra en un tanque de depósito para la inactivación de los virus.

### III. Virus ilustrativos y determinación de la inactivación de los virus

El virus puede "eliminarse" mediante dos mecanismos principales: eliminación (por ejemplo, mediante filtración o cromatografía) o inactivación (por ejemplo, pH bajo, detergente o irradiación). Las recomendaciones regulatorias para la eliminación de virus de productos biofarmacéuticos pueden encontrarse en varios documentos emitidos por la FDA y EMEA.

Las capacidades de aclaramiento viral de un proceso se evalúan mediante el uso de versiones a escala reducida de operaciones unitarias individuales. Una muestra de alimento del proceso representativo se "enriquece" con una cantidad conocida de virus para simular una contaminación viral, y se mide la cantidad de virus eliminada o inactivada por la operación. Se recomienda que la cantidad de virus usada para la adición sea "lo más alta posible para determinar la capacidad de la etapa de producción para inactivar/eliminar virus de manera adecuada". Sin embargo, el volumen de adición de virus no debe ser tan grande que la composición del material de producción se altere significativamente; un volumen de adición de 10 % se considera generalmente como la adición máxima aceptable.

El virus generalmente se mide a partir de muestras recolectadas antes y después de las operaciones unitarias individuales en un proceso de purificación mediante el uso de ensayos que cuantifican las partículas de virus infecciosos. El aclaramiento se informa en términos de la reducción  $\log_{10}$  lograda (valor de reducción logarítmica o LRV). Cuando una operación unitaria logra un aclaramiento en tal grado que no se detecta virus en el material procesado, el LRV mínimo se determina mediante el uso de un cálculo que depende del título de virus en la alimentación inicial y la cantidad de material final muestreado. En consecuencia, el LRV que puede reivindicarse por etapas de aclaramiento altamente eficaces puede elevarse mediante el uso de cepas de virus de alto título que permitan altos niveles de reto de adición y ensayos de virus de gran volumen que aumentan la sensibilidad del ensayo. Por el contrario, el LRV demostrable puede reducirse cuando los materiales de alimentación son citotóxicos o interfieren con la infección viral de las células de detección, ya que esto puede requerir la dilución de la muestra, lo que disminuye la sensibilidad del ensayo.

Se conocen varios métodos en la técnica para analizar la infectividad de los virus. El ensayo de cultivo de tejidos con dosis infecciosa al 50 % es uno de esos métodos para contar el número de partículas virales infecciosas en una muestra. El TCID<sub>50</sub> es la cantidad de un agente patógeno (virus) que producirá un efecto citopático en el 50 % de los cultivos inoculados. El valor de TCID<sub>50</sub> es proporcional, pero no igual, al número de viriones infecciosos en una muestra. Los títulos determinados con este método se informan típicamente como TCID<sub>50</sub>/mL.

Cuando el ensayo no detecta ningún virus, se determina un título máximo posible para la muestra mediante un cálculo del límite mínimo de detección (LOD). Este cálculo considera la sensibilidad del ensayo e informa la mayor cantidad de virus que podría haber en una muestra sin que el ensayo detecte ninguno. El resultado de estos cálculos es un título informado como " $\leq X$ ", lo que significa que el título real en la muestra es X o menor (con una certeza de 95 %). Este cálculo de LOD depende únicamente de la cantidad de muestra analizada y de las prediluciones realizadas en la muestra antes del análisis. Cuando el título se informa como " $\leq X$ ", el valor de reducción logarítmica (LRV) correspondiente se informa como " $\geq Y$ ", lo que significa que el LRV resultante es Y o superior.

Los estudios de validación del aclaramiento viral están diseñados para evaluar la capacidad de un proceso de purificación de MAb para eliminar o inactivar muchos tipos diferentes de virus. La FDA recomienda el uso de varios virus modelo que abarcan partículas grandes y pequeñas, genomas de ADN y ARN, así como también cepas con y sin envoltura de lípidos resistentes y químicamente sensibles. El fundamento es que la demostración de una eliminación sólida de un panel de virus adecuadamente diverso proporciona la seguridad de que un contaminante viral desconocido y no detectado también se reduciría a niveles mínimos. En la Tabla 1 se muestran cuatro virus que se ajustan a estas pautas, que resume las propiedades de un panel de virus modelo apropiado para la validación del aclaramiento viral del proceso de MAb (adaptado de ICH Q5A)

Tabla I

Virus	Familia	Huésped natural	Tipo de genoma	Envoltura	Diámetro (nm)	Forma	Resistencia a los tratamientos fisicoquímicos
Virus minúsculos de ratones	Parvo	Ratón	ADN	no	18-24	Icosaédrica	Muy alto
Virus de la leucemia murina xenotrópica	Retro	Ratón	ARN	sí	80-110	Esférico	Bajo
Virus de la pseudorrabia	Herpes	Cerdo	ADN	sí	120-200	Esférico	Medio
Reovirus 3	Reo	Varios	ADN	no	60-80	Esférico	Medio

Generalmente, los contaminantes virales se dividen en dos categorías amplias: virus endógenos que se sabe que están presentes en el material de origen y agentes adventicios que pueden infiltrarse en el proceso.

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para inactivar estas dos categorías de virus.

#### IV. Mezcladores estáticos

Aunque los mezcladores estáticos se usan en otras industrias para mezclar en línea, no se han usado ampliamente en la industria farmacéutica porque los procesos generalmente operan en modo discontinuo. Además, aunque se han descrito técnicas de dilución y mezclado de tampones en línea para procesos de purificación de proteínas (por ejemplo, en sistemas comerciales ofrecidos por TechniKrom, BioRad y GE Healthcare), no se ha usado para la inactivación de los virus, especialmente porque la inactivación de los virus se realiza generalmente en tanques de depósito para procesos a gran escala.

Un experto en la técnica reconocerá que pueden usarse numerosos dispositivos de mezcla estática en la presente invención, siempre que el mezclador interrumpa el flujo de líquido para permitir un mezclado completo.

Los mezcladores estáticos pueden combinar dos funciones en el espacio de un tubo: división de flujo y turbulencia. La función de división de flujo se logra mediante una serie de subelementos desplazados mediante los cuales el fluido que sale de un elemento colisiona en la pala frontal del siguiente, que está desplazado 90 grados. La turbulencia es causada por la forma de tornillo de los subelementos que hace que el fluido gire. La turbulencia es inducida por la incapacidad del fluido para moverse laminarmente con los elementos de flujo y se ve exagerada por el aumento de los regímenes de flujo. La medición de esta funcionalidad de mezclado fluido se da en el número de Reynolds, Re. A velocidades de flujo bajas y, por lo tanto, bajo Re, los mezcladores estáticos operan en el intervalo de flujo laminar. Esta función de mezclado permite que el líquido de activación fresco sin reaccionar, como un tampón ácido, interactúe con el virus de manera más eficiente y elimine la oclusión del virus por el líquido de activación usado. En el caso de un mezclador por lotes, el proceso depende de la eficiencia de barrer el fluido de activación viejo y reemplazarlo con el nuevo fluido de activación.

Los dispositivos de mezclado estático o mezcladores estáticos están disponibles en una variedad de materiales (por ejemplo, acero inoxidable, Teflon™, cobre). Al seleccionar materiales para los mezcladores estáticos usados en los métodos descritos en la presente descripción, es conveniente seleccionar materiales que no reaccionen ni provoquen reacciones en los componentes de la muestra que fluyen a través del mezclador estático. Es conveniente además que el material sea duradero y susceptible de esterilización (por ejemplo, mediante autoclave o tratamiento con cloro), especialmente si la muestra se va a administrar a un ser humano u otro animal. Un mezclador estático puede ser opaco o transparente.

En algunas modalidades de acuerdo con los métodos descritos en este documento, un mezclador estático es parte de un sistema que incluye sensores de control de flujo de masa y pH en la entrada, el medio y la salida del mezclador estático. Los regímenes de flujo relativos de la muestra (por ejemplo, el eluato de la etapa de cromatografía de unión y elución aguas arriba), ácido y base se ajustan continuamente para garantizar el valor de pH conveniente. Se usa un software de control que se basa en el intervalo de datos previamente generado para que el algoritmo de retroalimentación pueda basarse en modelos y, por lo tanto, sea más eficiente que los sistemas tradicionales. Por ejemplo, el grupo de sensores de entrada, el pH y el régimen de flujo, pueden usarse para determinar la velocidad de alimentación de adición de ácido adecuada ( $F_A$ ). Puede usarse un algoritmo de control adicional que prediga el valor de pH final previsto a un pH de 2,0. Si el valor no se alcanza correctamente, la bomba  $F_A$  se cambia para llevar el fluido al valor correcto. Esto podría ocurrir por varias razones, por ejemplo, existe una capacidad de tampón adicional dentro de la alimentación de la etapa cromatográfica o el valor de titulación puede no ser lineal.



## V. Proceso de inactivación de los virus mediante un mezclador estático en línea

Como se describió anteriormente, en algunas modalidades de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción, se usa un mezclador estático en línea para lograr una inactivación eficaz de los virus.

Con el fin de permitir la inactivación continua de los virus a pH bajo para un proceso continuo, como se en la presente descripción, el eluato de la etapa de cromatografía de unión y elución anterior en el proceso de purificación (por ejemplo, eluato de proteína A) se mezcla en línea con ácido (generalmente ácido acético 1 a 3 M) mediante una válvula de 3 vías y se pasa a través de un mezclador estático. Las dimensiones del mezclador estático se eligen para permitir un mezclado eficiente de las corrientes de ácido y de producto. Con el fin de proporcionar un tiempo de residencia suficiente (típicamente 1-5 min) para la inactivación robusta de los virus, puede seguir un tubo de volumen suficiente después del mezclador estático. La corriente de virus inactivados se mezcla luego con la base (generalmente tris-base 1-2 M a pH 11) mediante el uso de una válvula de 3 vías y se pasa a través de un mezclador estático para permitir que la mezcla aumente el pH a un pH conveniente para la siguiente etapa de purificación en el proceso continuo, que típicamente aumenta de pH 5 a 8.

El diámetro del mezclador estático y el número de elementos pueden elegirse para permitir un mezclado eficiente en dependencia del régimen de flujo total de la corriente (es decir, alimentación + régimen de flujo ácido/base), densidad y viscosidad. El régimen de flujo se elige para garantizar un tiempo de residencia adecuado junto con la selección del mezclador estático (número y diámetro). El escalado se realiza manteniendo constante el número de Reynolds, Re. Notablemente, en los métodos de acuerdo con la presente invención, el régimen de flujo se mantiene lo suficientemente bajo para que Re permanezca en el intervalo de flujo laminar.

## VI. Proceso de inactivación de los virus mediante el uso de un tanque de compensación

En algunas modalidades de acuerdo con la presente invención, la inactivación de los virus se logra mediante el uso de un tanque de compensación.

Los métodos de inactivación de los virus de acuerdo con la presente invención pueden usarse como parte de cualquier proceso de purificación de proteínas, por ejemplo, un proceso de purificación realizado en un modo discontinuo o un proceso de purificación realizado en un modo continuo.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los métodos de inactivación de los virus son parte de un proceso de purificación continuo que emplea varias etapas de proceso (u operaciones unitarias) que están presentes tanto aguas arriba como aguas abajo del método de inactivación de los virus.

En algunas modalidades, la etapa del proceso de cromatografía de unión y elución, que normalmente se realiza antes de la etapa de inactivación de los virus en un proceso de purificación de proteínas, se realiza en modo discontinuo. Una operación típica de cromatografía de unión y elución en modo discontinuo emplea una columna grande con múltiples corridas, usualmente de 1 a 10, para procesar un lote de alimentación de cultivo celular clarificado. Por consiguiente, en algunas modalidades, una vez que se ha ejecutado un proceso en modo discontinuo, el material de elución puede recolectarse y bombearse a un tanque de compensación para realizar la inactivación de los virus. En el caso de un proceso de cromatografía de elución y unión en modo discontinuo, pueden usarse varios tanques de compensación para la inactivación de los virus. Debido al tamaño más pequeño del tanque de compensación, se logra una mezcla e inactivación de los virus más eficientes.

En algunas otras modalidades, la etapa del proceso de cromatografía de unión y elución se realiza en un modo continuo. En una modalidad particular, el proceso continuo es un proceso de cromatografía continua múltiple, también denominado CMC.

En el caso de una operación de CMC, típicamente se usan varias columnas pequeñas; con cada corrida varios (típicamente 10-50) ciclos para procesar un lote de alimentación de cultivo celular. Debido al pequeño tamaño de la columna y al gran número de ciclos, un enfoque de CMC tiene múltiples eluciones pequeñas que requieren inactivación de los virus. En lugar de recolectar las pequeñas eluciones en un tanque de depósito para la inactivación de los virus, en algunas modalidades se usa un tanque de compensación.

El uso de un tanque de compensación, como se describe en la presente descripción, proporciona una mejor homogeneidad de la solución de manera más eficiente debido a su tamaño más pequeño y mejores capacidades de mezclado, en relación con un tanque de depósito usado en procesos convencionales. Después, la solución se mantiene durante un tiempo suficiente para una inactivación robusta de los virus, generalmente de 1 a 30 minutos o menos de 1 hora, es decir, significativamente más corto de lo que se requiere cuando se usa un tanque de depósito más grande. Después de la etapa de retención, el pH y la conductividad se ajustan en el tanque de compensación al valor conveniente establecido para la siguiente operación unitaria. La solución de virus inactivados se bombea para alimentar la siguiente operación unitaria. Una vez vaciado, el tanque de compensación usado para la inactivación de los virus puede usarse para recolectar eluciones posteriores, en el caso del proceso CMC. Dado el tiempo apropiado

y el tamaño del tanque de compensación, solo puede necesitarse un tanque de compensación para lograr la inactivación de los virus en el caso del proceso CMC. Las eluciones individuales del proceso de múltiples columnas se tratan de manera similar para la inactivación de los virus.

5 Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

Ejemplo 1. Dependencia del tiempo de inactivación del virus X-MuLV con pH bajo en tubos de ensayo

En este experimento representativo, un retrovirus añadido a una solución que contiene un MAb se inactiva mediante incubación breve a pH bajo. El objetivo del experimento es comprender el pH y el tiempo de exposición necesarios para la inactivación completa del retrovirus en una solución que contiene altas concentraciones de proteína (anticuerpo). El tiempo mínimo requerido para inactivar X-MuLV se determina en un intervalo de pH de 3,1-3,5. El experimento se realiza en tubos de ensayo. El tiempo experimental máximo probado para inactivación es de cinco minutos mediante el uso de un mezclador estático.

La muestra usada es IgG policlonal de 20 mg/mL (Seracare) en tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 5,3. La predilución usada para evitar la citotoxicidad del tampón es 1/50. Para alcanzar el objetivo de LRV > 4, se usa una reserva de X-MuLV de título TCID<sub>50</sub>/mL de 7,0 para aumentar la alimentación a TCID<sub>50</sub>/mL de 6,0 log (adición de ~10 %). Teniendo en cuenta la predilución 1/50 y la dilución de ~1/5 del material en el proceso de acidificación y neutralización de la muestra (1/250 en total), esto resulta en un LRV observado de > 4,44 (asumiendo que se alcanza el nivel de adición objetivo). Los medios de ensayo usados son medios de titulación X-MuLV estándar: McCoy's + FBS al 1 %, 1X penicilina/estreptomicina, 1X L-glutamina, 1X NEAA. Los resultados se resumen en la Tabla II a continuación.

Tabla II

#### Valores de reducción logarítmica de X-MuLV (LRV)

pH objetivo	~7	3,10	3,50
pH real	~7	2,85	3,36
1 min	no probado	≥ 4,36	≥ 4,75
3 min	no probado	≥ 4,36	≥ 4,75
5 min	0,1	≥ 4,36	≥ 4,75

Los resultados indican claramente que X-MuLV se inactiva rápidamente hasta el punto de no ser detectado en un minuto a pH 2,85 y 3,36. No se observa inactivación a pH 7. La alta concentración de proteína (20 mg/mL de IgG policlonal Seracare) de estos tampones no es un impedimento para lograr una inactivación rápida (ver, por ejemplo, Kurt Brorson y otros, "Bracketed Generic Inactivation of Rodent Retroviruses by Low pH Treatment for Monoclonal Antibodies and Recombinant Proteins," Biotech. Bioeng. Vol. 82, núm. 3 (2003))

Ejemplo 2. Dependencia del tiempo de inactivación del virus X-MuLV con pH bajo en tubos de ensayo para anticuerpos policlonales y monoclonales

En este experimento representativo, se sigue el mismo protocolo que se describió en el Ejemplo 1, con el fin de comprender mejor a qué pH no hay inactivación del virus, o alternativamente, el pH mínimo donde hay inactivación.

Se usan tanto IgG policlonal (Seracare) como dos anticuerpos monoclonales (MAb05 y MAb04) producidos en células CHO. Los resultados se resumen en la Tabla III a continuación, donde los resultados con "≥" indican que no se detecta virus en la muestra.

Tabla III

MAb5		MAb04		Seracare		Seracare	
tiempo (min)	LRV a pH 3,7	tiempo (min)	LRV a pH 3,7	tiempo (min)	LRV a pH 4	tiempo (min)	LRV a pH 5
1,3	3,27	1,4	2,51	10	0,51	10	0
2,3	3,45	2,3	2,9	20	1,01	20	0
5	3,54	5	3,1	30	1,01	30	0
10	≥ 4,3	10	≥ 4,0	45	1,01	45	0,13
				60	1,26	60	0

Como los resultados de la Tabla III indican que medio minuto es adecuado para la inactivación del virus a pH 3,3. Aumentar el pH a 3,6 extiende el tiempo necesario a 1,1 minutos. Se requieren diez minutos a un pH superior a 3,6, mientras que a un pH 4 y superior, no se observa inactivación del virus incluso con una exposición de una hora.

### Ejemplo 3. Dependencia del tiempo de inactivación del virus X-MuLV con pH bajo con mezcladores estáticos

En este experimento representativo, se investiga el pH y el tiempo de exposición necesarios para la inactivación completa de retrovirus en una solución de alimentación con alto contenido de proteínas (MAb) mediante el uso de mezcladores estáticos.

En base a los resultados del Ejemplo 1, se investiga la posibilidad de inactivar un retrovirus mediante el uso de mezcladores estáticos en línea. El pH de la solución se reduce a medida que fluye a través de un canal mediante la inyección de ácido a una velocidad calculada para reducir el pH a 3,4. En el extremo aguas abajo del canal, el pH se vuelve a ajustar a neutral para la siguiente etapa del proceso. Este experimento determina el tiempo de exposición necesario para inactivar X-MuLV mediante el uso de una técnica en línea. La configuración experimental se muestra en la Figura 1.

La muestra usada es IgG policlonal de 9,9 g/L (Seracare) en tampón de ácido acético 20 mM a pH 5,0. El alimento enriquecido con virus se pasa a través de la configuración experimental que se muestra en la Figura 1 para la inactivación del pH en línea. La configuración consiste en: (a) una bomba peristáltica para transferir la muestra de alimentación; (b) dos bombas de jeringa para administrar ácido y base; (c) dos sondas de pH en línea; y (d) dos mezcladores estáticos. Los regímenes de flujo están predeterminados en modo discontinuo en función de la cantidad de ácido/base necesaria para lograr el pH de interés. El tiempo de residencia para la inactivación del virus se modifica mediante el uso de tubos de diámetro y longitud apropiados después del mezclador estático y antes de la sonda de pH. Los resultados se resumen en la Tabla IV a continuación.

Tabla IV

Seracare		Seracare	
tiempo (min)	LRV a pH 3,3	tiempo (min)	LRV a pH 3,6
0,5	≥ 3,6	0,6	2,80
0,9	≥ 3,6	1,1	≥ 3,6
1,4	≥ 3,6	1,7	≥ 3,6
2,3 <sup>#</sup>	≥ 3,6	2,8 <sup>#</sup>	≥ 3,6
3,5	≥ 3,6	4,4	≥ 3,6

<sup>#</sup>3 fracciones, en sucesión, durante 90 segundos cada una se recogen para asegurar la inactivación de virus consistente en el marco de tiempo 4,5 min

Como se resume en la Tabla IV, la inactivación completa se observa a pH 3,3 para todos los puntos de tiempo. Para pH 3,6, un tiempo ≥1,1 min da una inactivación completa. Además, las fracciones recolectadas en tiempos de residencia de 2,3 y 2,8 min muestran una inactivación completa del virus durante el período de tiempo de 4,5 min de la recopilación de datos, lo que indica que la inactivación del virus en línea con pH bajo es constante a lo largo del tiempo.

### Ejemplo 4. Dependencia del tiempo de inactivación del virus X-MuLV con pH bajo con mezcladores estáticos

En este experimento representativo, se investiga el pH y el tiempo de exposición necesarios para la inactivación completa de retrovirus en una solución de alimentación con alto contenido de proteínas (MAb) cuando se usan mezcladores estáticos. La configuración experimental se muestra en la Figura 1.

La muestra usada es IgG policlonal de 20 mg/mL (Seracare) en tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 5,3. La predilución usada para evitar la citotoxicidad del tampón es 1/50. Para alcanzar el objetivo de LRV > 4, se usa una reserva de X-MuLV de título TCID<sub>50</sub>/mL de 6,9 para aumentar la alimentación a TCID<sub>50</sub>/mL de 5,6 log (adición de ~10 %). Los medios de ensayo usados son medios de titulación X-MuLV estándar: McCoys + FBS al 1 %, 1X penicilina/estreptomicina, 1X L-glutamina, 1X NEAA.

Para la acidificación y neutralización se usan ácido acético 3 M y tampón tris 2 M. Las muestras de control también se generan mediante el uso de solo tubos (sin mezclador estático) para verificar directamente el efecto del mezclador estático. Los resultados se resumen en la Tabla V a continuación.

Tabla V

Muestra	Tiempo (min)	Título (log TCID <sub>50</sub> )	LRV
Mantener pH 7	>60	3,8	n/a
pH 3,4 con mezclador estático	0,5	≤ 1,5	≥2,2, <4,3
	1	2,9	0,9
	2	≤-0,5	≥ 4,3
	3	≤-0,5	≥ 4,3
pH 3,4 sin mezclador estático	0,25	3,3	0,4
	0,5	3,3	0,5
	1	3,1	0,7
	2	3,0	0,7
pH 7 con mezclador estático	3	4,1	-0,3
TFF/UC 2.4 Prep (control positivo)	n/a	6,5	n/a

Como se resume en la Tabla V, no se observa inactivación de virus para el control positivo y las dos muestras expuestas a pH 7, ya sea cuando se mantienen en un tubo de ensayo o cuando se pasan a través de un mezclador estático en el tiempo máximo de exposición, 3 min. Las muestras tomadas a través del mezclador estático muestran una inactivación completa del virus a veces más de un minuto. El mezclador estático es fundamental para la inactivación del virus, ya que se produce muy poca inactivación en su ausencia. Se requieren al menos dos minutos a un pH objetivo de 3,4 para lograr > 4 LRV de X-MuLV. El mezclador estático en sí no causa ninguna inactivación a pH neutro.

Ejemplo 5. Dependencia del tiempo de inactivación del virus X-MuLV mediante el uso de ácido caprílico y detergentes en tubos de ensayo

En este experimento, la inactivación del virus se realiza en un tubo de ensayo con el fin de determinar el tiempo mínimo y los requisitos de pH para la inactivación del virus cuando se usan varios aditivos, como ácido caprílico y detergentes como Triton X, Tween y sus combinaciones.

En este experimento se usan tanto Mab puro en tampón como Mab en cultivo celular clarificado. Aunque se sabe que los aditivos anteriores efectúan la inactivación de los virus, este ejemplo demuestra que mediante el uso de mezcladores estáticos, la inactivación de los virus puede obtenerse en un período de tiempo más corto. Los resultados de este experimento representativo se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI

Tiempo (min)	Caprilato 200 mM pH 7	Caprilato 20 mM pH 5,5	MAB07 puro			Cultivo de células MAB05		
			Tritón X (0,5 %)	Tween (1 %)	TNBP/Tween 20	Caprilato 200 mM pH 7	Caprilato 20 mM pH 5,5	Tritón X (0,5 %)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	≥ 3,1	≥ 3,1	≥ 3,1	0,5	≥ 3,1	2,91	2,63	≥ 3,1
5	≥ 3,1	≥ 3,1	≥ 3,1	1	≥ 3,1	≥ 3,8	≥ 3,8	≥ 3,1
10	≥ 3,1	≥ 3,1	≥ 3,1	1,8	≥ 3,1	≥ 3,8	≥ 3,8	≥ 3,1
20	≥ 3,1	≥ 3,1	≥ 3,1	2,2	≥ 3,1	≥ 3,8	≥ 3,8	≥ 3,1

Como se muestra en la Tabla VI, en el caso de MAb purificado, un minuto parece ser adecuado para la inactivación completa del virus con todos los aditivos usados excepto Tween. En el caso del cultivo celular clarificado, solo Triton X al 0,5 % resultan en la inactivación completa del virus después de un minuto, mientras que el caprilato para ambos pH y salinidades requiere un mínimo de cinco minutos.

Ejemplo 6. Efecto de la concentración de sal y MAb sobre la inactivación del virus X-MuLV a pH 3,6 mediante el uso de mezcladores estáticos

En este experimento representativo, se investiga el efecto de la concentración de MAb y sal sobre el tiempo y el pH mínimos necesarios para la inactivación del virus. Se prepara MAb a 21,8 g/L mediante el uso de ácido acético 20 mM, pH 3,2 y después se titula a pH 5,0 mediante el uso de NaOH 10 M. La conductividad de esa solución es de 1,4 mS/cm. Las concentraciones más bajas se preparan mediante dilución con ácido acético 20 mM, pH 3,2 y después se titula a pH 5 mediante el uso de NaOH 10 M. La conductividad de estas soluciones es de 1,4 mS/cm. La solución con alto contenido de sal se ajusta mediante la adición de NaCl hasta una molaridad final de 250 mM. Todas las soluciones se ajustan a pH 3,6 para la inactivación del virus mediante el uso de la configuración del mezclador estático en línea. Los resultados se resumen en la Tabla VII.

Tabla VII

	[IgG] g/L	[NaCl] mM	tiempo (s)	LRV
5	4,4	0	20	2,8
	4,4	0	40	3,5
	4,4	0	60	3,5
	4,4	250	20	3,9
	4,4	250	40	4
	4,4	250	60	4
10	21,8	0	20	3,5
	21,8	0	40	≥ 4,3
	21,8	0	60	≥ 4,3

Como se resume en la Tabla VII, la solución más relevante es la que tiene una alta concentración de MAb y la baja concentración de sal, que imita un material de elución de proteína A. Para una muestra de este tipo, se considera que 40 segundos son suficientes para la inactivación completa del virus a un pH de 3,6.

Ejemplo 7. Efecto del pH sobre la inactivación del virus X-MuLV mediante mezcladores estáticos

En este experimento representativo, se investiga el efecto del pH sobre la inactivación del virus mediante el uso de mezcladores estáticos. Se prepara IgG a 9 g/L mediante el uso de ácido acético 20 mM, pH 3,2 y después se titula a pH 5,0 mediante el uso de NaOH 10 M. Después, todas las soluciones se ajustan al pH conveniente para la inactivación del virus mediante el uso de la configuración del mezclador estático en línea. Los resultados se resumen en la Tabla VIII a continuación.

Tabla VIII

	tiempo (s)	LRV a pH 3,4	LRV a pH 3,5	LRV a pH 3,6
30	20	3,2	3,1	3,1
	40	≥ 4	≥ 4	3,2
	60	≥ 4	≥ 4	≥ 4

Como se muestra en la Tabla VII, se requiere aproximadamente un minuto para la inactivación completa del virus a pH 3,6, mientras que tiempos aún más cortos son adecuados a pH más bajo.

Ejemplo 8. Efecto de la temperatura sobre la inactivación del virus X-MuLV mediante el uso de pH bajo

En este experimento representativo, se investiga el efecto de la temperatura sobre la inactivación del virus. Generalmente, la inactivación de virus en línea es particularmente propicia para la exposición de la solución a temperaturas más altas; por lo tanto, es importante determinar el efecto de la temperatura sobre la inactivación del virus.

La alimentación usada en este estudio es 9,9 g/L de IgG policlonal Seracare en acetato de sodio 20 mM, pH 5,0. Se transfieren tres alícuotas de 25 mL cada una a tres tubos de centrifuga de 50 mL separados. A 25 mL de esta alimentación, se añaden 1,4 mL de ácido acético 3 M, pH 2,5 para reducir el pH a 3,7. Uno de los tubos de centrifuga se deja a temperatura ambiente a 22 °C. Los otros dos tubos de centrifuga se colocan después en baños de agua ajustados a 10 °C y 35 °C. Tras el equilibrio, se miden la temperatura y el pH del líquido en los tubos (ver la Tabla IX a continuación). Posteriormente se añade un pico de virus de 10 % a cada uno de los tubos. Se recogen muestras de 5 mL en los puntos de tiempo estipulados y se añaden 0,4 mL de tris-base 2 M, pH 11,0 para aumentar el pH a pH 7,0.

Tabla IX

	Tiempo (min)	pH 3,6 a 12 °C	pH 3,67 a 22 °C	pH 3,78 a 33 °C
55	1	3,3	≥ 4,1	≥ 4,0
	2	≥ 4,3	≥ 4,1	≥ 4,0
	5	≥ 4,3	≥ 4,1	≥ 4,0
	10	≥ 4,3	≥ 4,1	≥ 4,0

Los resultados resumidos en la Tabla IX indican que se prefiere la temperatura alta para la inactivación del virus. Es sorprendente que incluso con un pH medido más alto, la temperatura más alta logre una inactivación completa en el punto de tiempo de 1 minuto.

Ejemplo 9. Uso de mezcladores estáticos para acelerar la estabilización del pH

En este experimento representativo, se investigó el uso de mezcladores estáticos para acelerar la estabilización del pH. En general, es conveniente que se minimice el tiempo necesario para que el pH alcance su valor deseado.

En este ejemplo, los experimentos se realizan a varios regímenes de flujo y longitudes y diámetros de tubo, todos seleccionados de modo que solo se logre el flujo laminar, es decir, con un número de Reynolds por debajo de 100. Los valores de pH deseados inicial y objetivo son  $5,0 \pm 0,1$  y  $3,3 \pm 0,1$ , respectivamente.

El tiempo necesario para alcanzar el valor de pH deseado se registra en función del tiempo o del volumen de solución procesado. El volumen se expresa en términos de volúmenes muertos del tubo y los datos se recopilan a un régimen de flujo de 10 mL/min. Los resultados se resumen en la Tabla X a continuación.

Tabla X

		# de Reynolds	# de volúmenes muertos (unidades adimensionales)
15	Sin mezclador estático	40-50	5
	mezcladores estáticos de 12 elementos	10-100	3
20	mezcladores estáticos de 24 elementos	<10	2

Los resultados mostrados en la Tabla X indican que la estabilización del pH ocurre más rápidamente cuando se usan más elementos mezcladores estáticos, mientras que aún permanece bien en el flujo laminar.

Ejemplo 10. Inactivación del virus en línea sobre eluato de proteína A

En este experimento representativo, un cultivo celular clarificado de un MAb se somete a cromatografía con proteína A. El eluato de proteína A se recoge en diez fracciones separadas, que abarcan aproximadamente tres volúmenes de columna. Cada fracción se ajusta por separado a dos valores de pH, 3,3 y 3,6. Se determinan las cantidades de ácido necesarias para reducir el pH al valor deseado y de base necesaria para luego aumentar el pH al valor deseado, como se describe en el presente documento. Estas cantidades son diferentes para cada fracción porque las diferentes cantidades de MAb dan como resultado una capacidad tampón diferente para cada muestra.

Después se construye un modelo de las cantidades de ácido y base en función del volumen de eluato. Se realiza un segundo experimento en el que el eluato de proteína A se ajusta continuamente al pH deseado según el modelo construido. La concentración de virus se mide después de la inactivación del virus para confirmar que se logra la inactivación del virus.

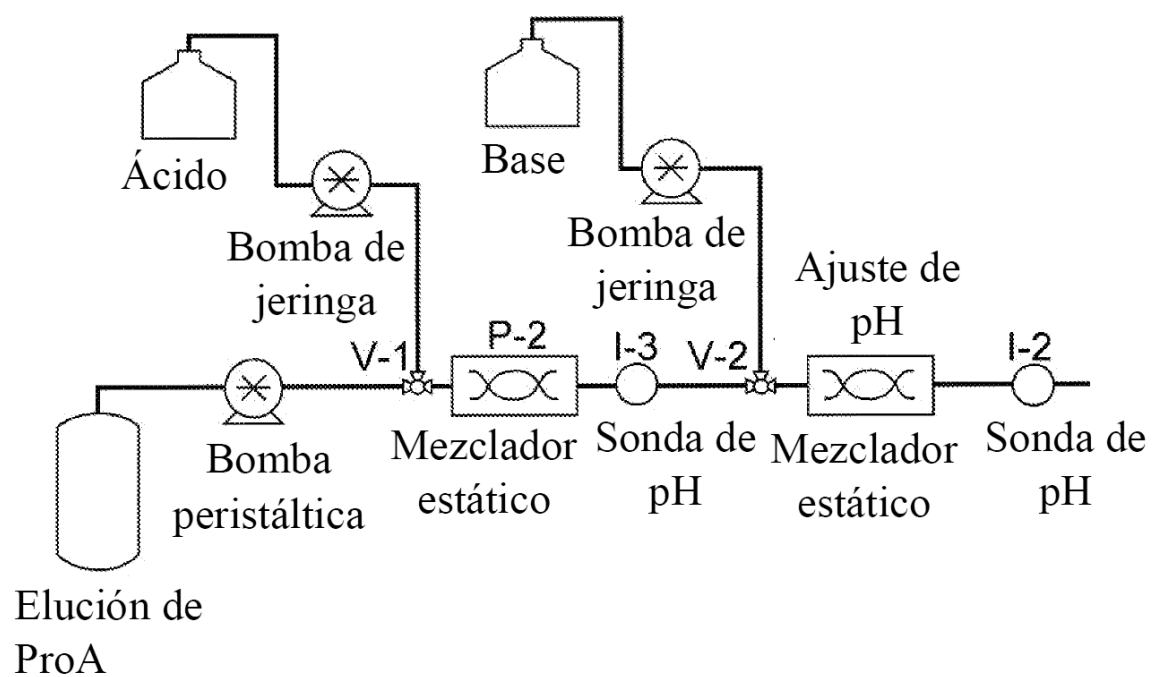
Ejemplo 11. Efecto de la inactivación del virus en línea sobre la calidad del MAb

En este experimento representativo, se investiga el efecto beneficioso de un tiempo de exposición más corto sobre la calidad del producto MAb. Se purifican dos anticuerpos monoclonales mediante el uso de cromatografía con proteína A, las muestras se recogen en tubos de ensayo y se incuban inmediatamente a varios pH (es decir, pH 3, 3,3, 3,6 y 4) y tiempos (es decir, 1, 2, 5 y 15 y 90 minutos).

Después, las muestras se neutralizan y analizan la presencia de agregados mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y geles SDS y los cambios en las variantes de carga mediante cromatografía de intercambio catiónico débil (WCX-10). La identidad de la proteína resultante también se analiza mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para inactivar uno o más virus en una muestra, en donde el método comprende mezclar continuamente la muestra con uno o más agentes inactivantes de virus a medida que la muestra fluye de la primera operación unitaria a la segunda operación unitaria durante un proceso para purificar una molécula objetivo.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la primera operación unitaria comprende cromatografía de unión y elución y la segunda operación unitaria comprende un proceso de purificación de flujo continuo.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en donde la cromatografía de unión y elución comprende cromatografía de afinidad a proteína A.
4. El método de la reivindicación 2, en donde el proceso de purificación de flujo continuo comprende dos o más matrices seleccionadas del grupo que consiste en carbón activado, medio de cromatografía de intercambio aniónico, medio de cromatografía de intercambio catiónico y medio de filtración de virus.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra comprende una un eluato de proteína A.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la molécula objetivo es un anticuerpo o una proteína que contiene una región Fc.
- 25 7. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra se mezcla con uno o más agentes inactivantes de virus mediante el uso de uno o más mezcladores estáticos en línea, o uno o más tanques de compensación.
8. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más agentes inactivantes de virus se seleccionan del grupo que consiste en un ácido, una sal, un solvente y un detergente.
- 30 9. El método de la reivindicación 7, en donde el flujo de muestra está en el intervalo de flujo laminar.
10. Un método para inactivar uno o más virus en un eluato de proteína A, el método comprende mezclar el eluato con uno o más agentes inactivantes de virus mediante el uso de:
  - 35 a) uno o más mezcladores estáticos en línea, en donde la inactivación completa de los virus se logra en menos de 10 minutos o menos de 5 minutos o menos de 2 minutos o menos de 1 minuto, o
  - b) un tanque de compensación, en donde la inactivación completa de los virus se logra en menos de 1 hora o menos de 30 minutos.
- 40 11. Un método para inactivar uno o más virus, el método comprende:
  - (a) someter una muestra que comprende una proteína objetivo a un proceso de cromatografía de afinidad a proteína A, para obtener así un eluato; y
  - 45 (b) transferir continuamente el eluato a un mezclador estático en línea para mezclar uno o más agentes inactivantes de virus con el eluato durante un período de tiempo igual o inferior a 10 minutos,
 para inactivar así uno o más virus.
- 50 12. El método de la reivindicación 11, en donde el proceso de cromatografía de afinidad a proteína A se realiza en modo discontinuo, o
  - un modo continuo, y en cuyo caso opcionalmente
  - en donde el proceso comprende cromatografía continua de múltiples columnas.
- 55 13. El método de la reivindicación 11, en donde el uno o más agentes inactivantes de virus es un ácido.
14. El método de la reivindicación 11, en donde la proteína objetivo es un anticuerpo.
- 60 15. El método de la reivindicación 11, que comprende además la etapa de transferir continuamente la salida de la etapa (b) a una etapa del proceso de purificación de flujo continuo; y opcionalmente en donde la etapa de purificación de flujo continuo comprende dos o más matrices seleccionadas de carbón activado, medio de intercambio aniónico, medio de intercambio catiónico y filtro de virus.

**Figura 1**