

PROCESAMIENTO DE CLARA DE HUEVO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de EE.UU. No. 61/983,003, presentada el 23 de abril de 2014, el contenido de la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

Las aves transgénicas (por ejemplo, pollos, codornices o pavos transgénicos) son un sistema de expresión deseable para la obtención de proteínas recombinantes exógenas para su uso en farmacéutica u otras aplicaciones comerciales que requieren grandes cantidades de suministro de proteína. Una gallina puede poner hasta 330 huevos por año, cada uno conteniendo 6.5 gramos de proteína. Aproximadamente 3.5 gramos de la proteína total es de clara de huevo, de los cuales el 90% se explica por siete proteínas diferentes; la ovoalbúmina por sí sola representa 2 gramos de la proteína de clara de huevo (aproximadamente 50% de la proteína de clara de huevo). En la actualidad, el producto del gen exógeno promedio derivado de la expresión específica del oviducto de un transgén y recuperado de la clara de huevo se sabe que es aproximadamente 5-10 mg por huevo. Las ventajas de la producción de proteína exógena en huevos de gallina incluyen tiempos de generación cortos y tasas prolíficas de reproducción a través de inseminación artificial. Varias proteínas se han expresado en huevos de pollos transgénicos. Véase, *por ejemplo*, la patente de EE.UU. No. 6,730,822 y la Publicación de EE.UU. No. 2006/0015960.

Muchas proteínas terapéuticas exógenas (por ejemplo, proteínas humanas recombinantes tales como citoquinas (por ejemplo, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos (GC-SF, por sus sigla en inglés), interferones, y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por su sigla en inglés)), anticuerpos, y varias enzimas lisosomales humanas) son de interés para la industria farmacéutica. Las proteínas terapéuticas se pueden obtener fácilmente en cantidades significativas de, por ejemplo, la clara de huevo de pollos transgénicos. Los métodos tradicionales para el aislamiento de proteínas exógenas de la clara de huevo, sin embargo, a menudo se basan en el uso de procedimientos de inmunoafinidad u otros procedimientos sólo adecuados para la producción a pequeña escala (por ejemplo, involucrando volumen de clara de huevo total de 5L como máximo). Para una producción de proteínas a gran escala, tal procedimiento no es práctico basado en costos, mano de obra y tiempo.

RESUMEN

Esta descripción se basa en el descubrimiento inesperado de que la adición de una pequeña cantidad de un tampón ácido (por ejemplo, en una sola inyección en bolo) a una piscina de clara de huevo (por ejemplo, obtenida a partir de huevos puestos por ave transgénica tales como pollos, codornices y pavos) de escala industrial (por ejemplo, que tiene un volumen de al menos 10 litros) se puede preparar la clara de huevo para el aislamiento cromatográfico a granel de proteínas recombinantes tales como proteínas terapéuticas humanas de la clara de huevo sin la necesidad de diluir la clara de huevo. Tal método puede reducir significativamente la cantidad de materiales de clara de huevo sujetos a los procesos corriente abajo de aislamiento/purificación (por ejemplo, la cantidad de las columnas utilizadas en el aislamiento cromatográfico), lo que reduce significativamente los costos, mano de obra y tiempo de aislamiento de proteínas recombinantes a partir de la clara de huevo. En consecuencia, los métodos descritos en la presente divulgación pueden mejorar en gran medida la eficiencia de la preparación de clara de huevo para una gran escala, industrial de la producción de proteína terapéutica.

En un aspecto, la presente divulgación incluye un método de preparación de clara de huevo para procesamiento cromatográfico a granel que incluye las etapas de: (1) adicionar un tampón ácido que comprende un agente ácido a una piscina de clara de huevo, siendo el tampón ácido de aproximadamente 0.5% en peso a aproximadamente 5% en peso por kilogramo de clara de huevo; y (2) mezclar el tampón ácido y la clara de huevo para formar una clara de huevo mezclada que tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.5.

En otro aspecto, esta divulgación presenta un método de aislamiento de una proteína recombinante a partir de clara de huevo que incluye las etapas de: (1) proporcionar una piscina de clara de huevo que contiene una proteína recombinante, la piscina teniendo un volumen de al menos aproximadamente 10 litros; (2) ajustar el pH de la clara de huevo a de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.5, en donde la conductividad de la clara de huevo de pH ajustado es de aproximadamente 8 mS/cm a aproximadamente 20 mS/cm; (3) filtrar la clara de huevo para formar una solución (es decir, una solución clara); y (4) aislar la proteína recombinante en la clara de huevo por cromatografía en columna.

En todavía otro aspecto, esta divulgación presenta un método de filtración de clara de huevo acidificada que incluye las etapas de: (1) hacer pasar un tampón de pre-tratamiento que tiene una conductividad de entre aproximadamente

8 mS/cm y aproximadamente 20 mS/cm a través de un filtro; y (2) hacer pasar clara de huevo que tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.5 a través del filtro para obtener una clara de huevo filtrada.

Las realizaciones pueden incluir una o más de las siguientes características.

El agente ácido puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en ácido acético, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido fluorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido cítrico, ácido bórico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido úrico y ácido barbitúrico.

El tampón ácido puede incluir además acetato de sodio de aproximadamente 5M a aproximadamente 6M (por ejemplo, aproximadamente 5.7 M).

El tampón ácido puede ser de aproximadamente 0.5% en peso a aproximadamente 2% en peso (por ejemplo, de aproximadamente 0.7% en peso a aproximadamente 1.5% en peso, de aproximadamente 0.9% en peso a aproximadamente 1.4% en peso, o de aproximadamente 1.2% en peso a aproximadamente 1.3 en peso %) por kilogramo de clara de huevo.

El tampón ácido puede tener un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 4.5, aproximadamente, 5, aproximadamente 5.5, aproximadamente 6.0 o aproximadamente 6.5).

Después de mezclar el tampón ácido con la clara de huevo, el pH de la clara de huevo mezclada puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.5. En algunas realizaciones, el pH de la clara de huevo mezclada es de 5 a aproximadamente 6.3 (por ejemplo, de aproximadamente 5.7 a aproximadamente 6.3, de aproximadamente 5.8 a aproximadamente 6.2, de aproximadamente 5.9 a aproximadamente 6.1, o aproximadamente 6). En algunas realizaciones, el pH de la clara de huevo mezclada es un valor tal que la clara de huevo mezclada se hace menos viscosa.

La clara de huevo se puede mezclar durante al menos aproximadamente 1 hora y/o a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 25°C.

La piscina de clara de huevo puede tener un volumen de al menos aproximadamente 10 litros (por ejemplo, al menos aproximadamente 50 litros).

El tampón ácido se puede añadir a la piscina de clara de huevo en una sola inyección en bolo y/o a una velocidad de al menos aproximadamente 1 L/minuto.

La adición del tampón ácido a la clara de huevo y la mezcla de la clara de huevo puede llevarse a cabo simultáneamente.

El método puede incluir además una etapa de permitir que la clara de huevo mezclada se asiente de manera que la clara de huevo se separe en capas superior, media e inferior. En tales realizaciones, el método puede incluir además una etapa de aislar la capa media. En algunas realizaciones, el método puede incluir además filtrar la capa media después de la etapa de aislamiento. El filtrado puede incluir hacer pasar al menos una porción (por ejemplo, todo) de la capa media a través de un filtro que tiene un tamaño medio de poro que varía de aproximadamente 0.1 μm a aproximadamente 100 μm . En algunas realizaciones, la filtración puede incluir hacer pasar al menos una porción de la capa media a través de una pluralidad de filtros.

El método puede incluir además filtrar la clara de huevo mezclada sin permitir que la clara de huevo mezclada se asiente. En tales realizaciones, la etapa de filtración puede incluir filtrar la clara de huevo mezclada a través de un filtro que tiene un tamaño medio de poro que varía de aproximadamente 0.1 μm a aproximadamente 100 μm . En algunas realizaciones, la etapa de filtración puede incluir una o más etapas de filtración posteriores después de un filtrado inicial de la clara de huevo mezclada, la una o más etapas posteriores de filtración utilizando uno o más filtros que tienen un tamaño medio de poro que varía de aproximadamente 0.1 μm a aproximadamente 40 μm .

El método puede incluir además una etapa de centrifugación después de la etapa de mezcla, en la que la clara de huevo mezclada se centrifuga para separar precipitados que contienen complejos de ovomucina-lisozima del sobrenadante.

La clara de huevo puede incluir una proteína terapéutica recombinante exógena a la clara de huevo.

El tampón ácido puede tener una conductividad de aproximadamente 8 mS/cm a aproximadamente 40 mS/cm.

El tampón ácido puede ser de aproximadamente 0.5% en peso a 5% en peso por kilogramo de clara de huevo.

Un tampón de pre-tratamiento puede ser utilizado para preparar filtros para el paso de la clara de huevo acidificada. El tampón de pretratamiento puede tener un pH sustancialmente similar a o el mismo que el pH de la clara de huevo, variando de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.5. Por ejemplo, el tampón de pre-tratamiento puede tener un pH de aproximadamente 5.9 a aproximadamente 6.1 (por ejemplo, aproximadamente 6).

El tampón de pre-tratamiento puede incluir fosfato de sodio y cloruro de sodio.

El tampón de pre-tratamiento puede tener una conductividad de aproximadamente 10 mS/cm a aproximadamente 20 mS/cm.

La clara de huevo acidificada puede tener una conductividad de aproximadamente 8 mS/cm a aproximadamente 20 mS/cm.

El filtro puede tener un área de medio de filtración de al menos aproximadamente 8 m².

El filtro puede tener un tamaño medio de poro de aproximadamente 0.1 µm a aproximadamente 100 µm.

La clara de huevo se puede hacer pasar a través del filtro a una presión diferencial inferior a aproximadamente 30 psi (por ejemplo, inferior a aproximadamente 15 psi).

Las realizaciones pueden tener las siguientes ventajas.

En general, las columnas cromatográficas utilizadas en el aislamiento/purificación de la proteína exógena a partir de la clara de huevo son muy costosas, lo cual puede ser uno de los factores limitantes clave en la producción a escala industrial y comercial de proteínas recombinantes a partir de clara de huevo. Debido a que sólo una pequeña cantidad de un tampón ácido se utiliza para obtenerla la clara de huevo acidificada, la cantidad de la clara de huevo acidificada utilizada para obtener proteínas terapéuticas purificadas se reduce significativamente (es decir, al menos 3 a 4 veces menos que los métodos de dilución convencional). Como resultado, el tiempo consumido para la carga de la clara de huevo acidificada a las columnas posteriores también se reduce significativamente, lo que permite la producción de proteínas rápida en un proceso industrial. Además, debido a que algunas proteínas terapéuticas son sensibles al entorno expuesto durante la preparación de la clara de huevo y los procesos de aislamiento/purificación, reducir al mínimo el tiempo empleado en la preparación y los procesos de aislamiento/purificación mediante la reducción de volumen de muestra es muy ventajoso para la producción comercial que normalmente implica un volumen de clara de huevo de 500L o más. En suma, el tiempo de procesamiento, materiales y mano de obra se pueden minimizar en gran medida mediante el uso de los métodos descritos en el presente documento.

Otras características, objetos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Esta divulgación se refiere a métodos eficaces para la preparación de la clara de huevo (por ejemplo, obtenida a partir de los huevos puestos por pollos transgénicos) para el aislamiento cromatográfico a granel de las proteínas (por ejemplo, proteínas recombinantes) de la clara de huevo, así como métodos de aislamiento de proteínas a partir de la clara de huevo. La clara de huevo

preparada por los métodos descritos en el presente documento esta generalmente en la forma de una solución homogénea de viscosidad baja que es adecuada para el procesamiento cromatográfico granel.

En algunas realizaciones, la clara de huevo utilizada como un material de partida de los métodos descritos en el presente documento puede incluir una proteína recombinante (por ejemplo, una proteína terapéutica recombinante) exógena a la clara de huevo. Proteínas recombinantes ejemplares incluyen citoquinas tales como GC-SF, GM-CSF, eritropoyetina, e interferones tales como el interferón- α o interferón- β ; enzimas lisosomales humanas; inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos); y proteínas estructurales. Otras proteínas recombinantes ejemplares que se pueden aislar a partir de procesamiento cromatográfico a granel se han descrito, por ejemplo, en la Publicación de la Solicitud de EE.UU. No. 2009/0299037.

En general, los métodos de preparación de la clara de huevo que se describen en el presente documento incluyen (1) adicionar una cantidad adecuada de un tampón ácido (por ejemplo, de aproximadamente 0.5% en peso a 5% en peso por kilogramo de clara de huevo) que contiene un agente ácido a una piscina de clara de huevo (por ejemplo, que tiene un volumen de al menos aproximadamente 10 litros); y (2) mezclar el tampón ácido y la clara de huevo para formar una clara de huevo mezclada que tiene un pH adecuado (por ejemplo, un pH que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.5).

En general, la piscina de clara de huevo utilizada en los métodos descritos en la presente memoria está a una escala industrial y tiene un volumen relativamente grande. Por ejemplo, la piscina de clara de huevo puede tener un volumen de al menos aproximadamente 10 litros (por ejemplo, al menos aproximadamente 50 litros, al menos aproximadamente 100 litros, al menos aproximadamente 200 litros, al menos aproximadamente 300 litros, al menos aproximadamente 400 litros, al menos aproximadamente 500 litros, por lo menos aproximadamente 600 litros, al menos aproximadamente 700 litros, al menos aproximadamente 800 litros, al menos aproximadamente 900 litros, al menos aproximadamente 1000 litros, al menos aproximadamente 1500 litros, al menos aproximadamente 2000 litros, al menos aproximadamente 3000 litros, al menos aproximadamente 4000 litros, al menos aproximadamente 5.000 litros, al menos aproximadamente 10.000 litros, o al menos aproximadamente 20.000 litros). Los métodos de preparación de clara de huevo como material de partida para ser usados en los métodos descritos en el presente documento se han descrito, por ejemplo, en la Publicación de la Solicitud de EE.UU. No. 2009/0299037.

El agente ácido en el tampón ácido puede ser generalmente cualquier ácido adecuado (por ejemplo, un ácido orgánico o un ácido inorgánico). Agentes ácidos ejemplares incluyen ácido acético, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido fluorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido cítrico, ácido bórico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido úrico, y ácido barbitúrico. En algunas realizaciones, una combinación de dos o más (por ejemplo, tres o cuatro) ácidos se puede utilizar como el agente ácido en el tampón ácido.

En algunas realizaciones, el tampón ácido puede incluir una o más sales (por ejemplo, sales alcalinas). Un ejemplo de tal sal puede ser acetato de sodio. En algunas realizaciones, la sal utilizada en el tampón ácido puede ser una sal del agente ácido utilizado en el tampón ácido. En otras realizaciones, la sal utilizada en el tampón ácido puede ser una sal de un ácido diferente del agente ácido utilizado en el tampón ácido. En algunas realizaciones, el tampón ácido puede incluir de aproximadamente 5M a aproximadamente 6M (por ejemplo, aproximadamente 5.7 M) de una sal (por ejemplo, acetato de sodio). Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que el uso de una sal que tiene una concentración tal puede resultar en un tampón ácido que tiene una cantidad adecuada de contenido de tampón. Si el contenido de tampón es demasiado alto, el tampón ácido pueden volverse inflamable y/o corrosivo, haciendo el tampón inseguro para mantener, manejar y/o almacenar. Si el contenido de tampón es demasiado bajo, podría ser necesario un mayor volumen de tampón ácido para ajustar el pH de la clara de huevo al valor objetivo, reduciendo de esta manera la eficiencia del proceso de preparación de la clara de huevo, así como de los procesos de aislamiento/purificación de proteínas corriente abajo.

En general, las cantidades del agente ácido y la sal usados en el tampón ácido pueden variar en función del pH deseado del tampón ácido. En algunas realizaciones, el tampón ácido puede tener un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.5 (por ejemplo, de aproximadamente 4 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 4 a aproximadamente 4.5). Por ejemplo, el tampón ácido puede tener un pH de aproximadamente 4 o un pH de aproximadamente 4.5.

El tampón ácido se puede formar por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, el tampón ácido se puede formar mediante la adición de un agente ácido a una solución que contiene una base para ajustar el pH de la solución a un valor deseado. Por ejemplo, se puede añadir solución de ácido acético glacial a una cantidad apropiada de NaOH para obtener un tampón ácido que contiene 5.7M de acetato de sodio.

En general, la cantidad del tampón ácido respecto a la de la clara de huevo es pequeña. Por ejemplo, el tampón ácido puede ser de aproximadamente 0.5% en peso a 5% en peso (por ejemplo, de aproximadamente 0.5% en peso a aproximadamente 2% en peso, de aproximadamente 0.7% en peso a 1.5% en peso, de aproximadamente 0.9% en peso a aproximadamente 1.4 % en peso, de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 1.4%, o de aproximadamente 1.1% en peso a aproximadamente 1.3% en peso) por kilogramo de clara de huevo. Convencionalmente, los esfuerzos para crear una clara de huevo de viscosidad baja, homogénea adecuada para el procesamiento cromatográfico a granel requiere adicionar un tampón ácido que tiene un volumen de 2 a 5 veces (es decir, 200% a 500%) del volumen de la clara de huevo, ya que no se esperaba que la adición de una pequeña cantidad de un tampón ácido sería eficaz en ajustar el pH de la clara de huevo al valor objetivo. Dicho proceso no es económicamente práctico ni factible a gran escala de fabricación debido a las limitaciones de tamaño de las columnas cromatográficas y otros equipos de fabricación utilizados en el proceso de preparación de clara de huevo. Inesperadamente, los presentes inventores descubrieron que una clara de huevo de baja viscosidad, homogénea adecuada para el procesamiento cromatográfico a granel se puede obtener mediante la adición de una pequeña cantidad de un tampón ácido (por ejemplo, como máximo aproximadamente 5% en peso por kilogramo de clara de huevo) respecto a la cantidad de clara de huevo, lo que reduce significativamente la cantidad de las columnas utilizadas en los procedimientos de aislamiento cromatográficos, los tamaños de otros equipos utilizados en estos procesos, y el costo y el tiempo de aislar proteínas recombinantes a partir de clara de huevo.

Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que las ventajas adicionales de adicionar una cantidad relativamente pequeña de un tampón ácido en relación con la cantidad de clara de huevo incluyen (1) dilución despreciable de la clara de huevo, (2) esencialmente ningún cambio en la conductividad, lo cual permite la precipitación de complejos de ovomucina-lisozima a partir de la clara de huevo, lo que a su vez reduce la viscosidad de la clara de huevo a un menor rango de pH (por ejemplo, pH 5 – 6.5) y facilita la separación de materiales no deseados de la clara de huevo durante la filtración y los procesos cromatográficos, y (3) minimizar la formación de bolsas de pH bajo dentro de la clara de huevo viscosa que potencialmente puedan dañar las proteínas recombinantes o resultar en pH desigual de los materiales de clara de huevo.

En general, el tampón ácido puede tener una conductividad que varía desde aproximadamente 8 mS/cm a aproximadamente 40 mS/cm. Por ejemplo, el tampón ácido puede tener una conductividad de al menos aproximadamente 8

mS/cm (por ejemplo, al menos aproximadamente 9 mS/cm, al menos aproximadamente 10 mS/cm, al menos aproximadamente 11 mS/cm, al menos aproximadamente 12 mS/cm, al menos aproximadamente 13 mS/cm, al menos aproximadamente 14 mS/cm, al menos aproximadamente 15 mS/cm, al menos aproximadamente 16 mS/cm, al menos aproximadamente 17 mS/cm, al menos aproximadamente 18 mS/cm, al menos aproximadamente 19 mS/cm, al menos aproximadamente 20 mS/cm, al menos aproximadamente 21 mS/cm, al menos aproximadamente 22 mS/cm, al menos aproximadamente 23 mS/cm, al menos aproximadamente 24 mS/cm, al menos aproximadamente 25 mS/cm) y/o como máximo aproximadamente 40 mS/cm (por ejemplo, como máximo aproximadamente 39 mS/cm, como máximo aproximadamente 38 mS/cm, como máximo aproximadamente 37 mS/cm, como máximo aproximadamente 36 mS/cm, como máximo aproximadamente 35 mS/cm, como máximo aproximadamente 34 mS/cm, como máximo aproximadamente 33 mS/cm, como máximo aproximadamente 32 mS/cm, como máximo aproximadamente 31 mS/cm, como máximo aproximadamente 30 mS/cm, como máximo aproximadamente 29 mS/cm, como máximo aproximadamente 28 mS/cm, como máximo aproximadamente 27 mS/cm, como máximo aproximadamente 26 mS/cm, o como máximo aproximadamente 25 mS/cm). Por ejemplo, el tampón ácido puede tener una conductividad de cualquier valor entre aproximadamente 8 mS/cm y aproximadamente 40 mS/cm. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que el uso de un tampón ácido que tiene una conductividad de aproximadamente 8 mS/cm a aproximadamente 40 mS/cm minimizaría los cambios en la conductividad de la clara de huevo mezclada de manera que el proceso se puede implementar y coordinar con la etapa de aislamiento de proteínas corriente abajo sin necesidad de cambiar las condiciones de aislamiento de la cromatografía en columna utilizada en la etapa de aislamiento y sin causar más precipitación o agregación.

En algunas realizaciones, el tampón ácido se puede añadir a la piscina de clara de huevo en una sola inyección en bolo. En alguna realización, la inyección en bolo único se realiza a una velocidad de inyección adecuada (por ejemplo, al menos aproximadamente 1 L/minuto) para asegurar que se añada la adición del tampón ácido dentro de una cantidad de tiempo adecuada (por ejemplo, como máximo aproximadamente 5 minutos). Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que las ventajas de utilizar una sola inyección en bolo incluyen (1) formar floculante relativamente grande que se asienta fácilmente por gravedad, reduciendo de ese modo la necesidad de grandes filtros y (2) evitar la necesidad de valoración continua de una piscina de clara de huevo viscosa, la cual puede causar falsas lecturas de pH que desencadenan adición repetida de un ácido o

una base, que a su vez puede dañar potencialmente las proteínas recombinantes en la clara de huevo y aumentar la turbidez de la solución de clara de huevo producida.

En algunas realizaciones, después de que se añade el tampón ácido a la piscina de clara de huevo, la clara de huevo se mezcla a una temperatura adecuada (por ejemplo, de aproximadamente 2°C a aproximadamente 25°C) durante un periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, al menos aproximadamente 1 hora) para formar una clara de huevo mezclada que tiene un pH adecuado. En algunas realizaciones, la adición del tampón ácido y la mezcla de la clara de huevo se realizan simultáneamente.

En general, la adición del tampón ácido y la mezcla del tampón ácido con la clara de huevo resultan en la formación de una gran cantidad de precipitados (por ejemplo, complejos de ovomucina-lisozima). Los precipitados generalmente reducen la viscosidad de la clara de huevo restante en la solución.

En algunas realizaciones, el pH de la clara del huevo mezclada es un valor tal que la clara de huevo mezclada se hace menos viscosa. Por ejemplo, la clara de huevo mezclada puede tener un pH de al menos aproximadamente 5 (por ejemplo, al menos aproximadamente 5.2, al menos aproximadamente 5.4, al menos aproximadamente 5.6, al menos aproximadamente 5.7, al menos aproximadamente 5.8 o al menos aproximadamente 5.9) y/o como máximo aproximadamente 6.5 (por ejemplo, como máximo aproximadamente 6.3, como máximo aproximadamente 6.2 o como máximo aproximadamente 6.1). En algunas realizaciones, la clara de huevo mezclada puede tener un pH de aproximadamente 6. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que un pH tal (por ejemplo, aproximadamente 6) puede permitir la formación de la mayor cantidad de precipitados a partir de la clara de huevo que se asientan por gravedad, lo que reduce la necesidad de filtración y facilita la formación de una solución de clara de huevo de baja viscosidad, homogénea.

En general, la clara de huevo mezclada (es decir, la clara de huevo de pH ajustado o acidificada) tiene una relativa conductividad baja (por ejemplo, similar a la conductividad de una clara de huevo no tratada con un tampón ácido). Por ejemplo, la clara de huevo mezclada puede tener una conductividad de al menos aproximadamente 8 mS/cm (por ejemplo, al menos aproximadamente 8,2 mS/cm, al menos aproximadamente 8,4 mS/cm, por lo menos aproximadamente 8,6 mS/cm, al menos aproximadamente 8,8 mS/cm, al menos aproximadamente 9 mS/cm, por lo menos aproximadamente 9,2 mS/cm, por lo menos aproximadamente 9,4 mS/cm, por lo menos aproximadamente 9,6 mS/cm, por lo menos aproximadamente 9,8 mS/cm, al menos aproximadamente 10 mS/cm, al

menos aproximadamente 11 mS/cm, al menos aproximadamente 12 mS/cm, al menos aproximadamente 13 mS/cm, o al menos aproximadamente 14 mS/cm) y/o como máximo aproximadamente 20 mS/cm (por ejemplo, como máximo aproximadamente 19 mS/cm, como máximo aproximadamente 18 mS/cm, como máximo aproximadamente 17 mS/cm, como máximo aproximadamente 16 mS/cm, como máximo aproximadamente 15 mS/cm, como máximo aproximadamente 14 mS/cm, como máximo aproximadamente 13 mS/cm, como máximo aproximadamente 12 mS/cm, como máximo aproximadamente 11.8 mS/cm, como máximo aproximadamente 11.6 mS/cm, como máximo aproximadamente 11.4 mS/cm, como máximo aproximadamente 11.2 mS/cm, como máximo aproximadamente 11 mS/cm, como máximo aproximadamente 10.8 mS/cm, como máximo aproximadamente 10.6 mS/cm, como máximo aproximadamente 10.4 mS/cm, como máximo aproximadamente 10.2 mS/cm, o como máximo aproximadamente 10 mS/cm). Por ejemplo, la clara de huevo mezclada puede tener una conductividad de cualquier valor entre aproximadamente 8 mS/cm y aproximadamente 20 mS/cm. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que el mantenimiento de la clara de huevo mezclada a conductividad de aproximadamente 8 mS/cm a aproximadamente 20 mS/cm permitiría que la clara de huevo mezclada cumpla con las condiciones utilizadas en la etapa de aislamiento de proteínas corriente abajo de modo que la clara de huevo mezclada se puede utilizar constantemente en la etapa de aislamiento sin cambiar las condiciones de aislamiento de la cromatografía en columna utilizada en este paso.

Una vez completada la mezcla, los métodos descritos en el presente documento pueden incluir un paso opcional de permitir que la clara de huevo mezclada se asiente durante un período de tiempo adecuado (por ejemplo, al menos aproximadamente 6 horas) de tal manera que la clara de huevo se separa en capas superior, media e inferior. Típicamente, la capa superior incluye ciertos materiales no deseados (por ejemplo, proteína desnaturalizada y lípidos espumosos incluyendo fosfolípidos, triglicéridos y colesterol) que tienen una baja densidad, la capa inferior incluye los precipitados formados a partir de las proteínas de clara de huevo (por ejemplo, complejos de ovomucina-lisozima), y la capa media incluye una solución de clara de huevo relativamente clara.

En algunas realizaciones, durante la etapa de asentamiento, si el pH de la clara de huevo mezclada llega a caer fuera del valor deseado (por ejemplo, 5.7 ± 0.1 , 6.0 ± 0.1 , o 6.3 ± 0.1), se puede ajustar para alcanzar el valor deseado utilizando un ácido (por ejemplo, el tampón ácido descrito anteriormente) o una base (por ejemplo, un acetato de sodio 5.7 M o solución de hidróxido de sodio 1 N). En tales realizaciones, el ajuste de pH puede ser seguido por un mezclado (por

ejemplo, durante al menos aproximadamente 1 hora) y asentamiento (por ejemplo, durante al menos aproximadamente 3 horas) adicional a temperatura ambiente. En general, el tiempo de mezcla y asentamiento total no es superior a 24 horas para minimizar el tiempo que las proteínas exógenas en la clara de huevo están expuestas al entorno de procesamiento, manteniendo de este modo las actividades biológicas de estas proteínas.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden incluir una etapa de aislar la capa media de la clara de huevo mezclada después de la etapa de asentamiento. En general, la capa media se puede aislar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la capa media puede ser desviada fuera del recipiente que contiene la clara de huevo mezclada mediante la inserción de un tubo (por ejemplo, un tubo de metal o policarbonato) en la capa media (preferiblemente en el centro de la capa media) de modo que el contenido de la capa media puede ser bombeada a un recipiente receptor sin perturbar las capas superior e inferior.

En general, después de aislada la capa media, al menos una parte de la capa media (por ejemplo, la totalidad de la capa media) se puede filtrar para eliminar las partículas suspendidas en la capa media para obtener una solución de clara de huevo clara, de baja viscosidad, homogénea. Este paso también se conoce como clarificación de clara de huevo. En algunas realizaciones, la capa media se puede filtrar a través de uno o más filtros que tienen un tamaño medio de poro de como máximo aproximadamente 100 μm (por ejemplo, como máximo aproximadamente 90 μm , como máximo aproximadamente 80 μm , como máximo aproximadamente 70 μm , como máximo aproximadamente 60 μm , como máximo aproximadamente 50 μm , como máximo aproximadamente 40 μm , como máximo aproximadamente 30 μm , como máximo aproximadamente 20 μm , como máximo aproximadamente 10 μm , como máximo aproximadamente 9 μm , como máximo aproximadamente 8 μm , como máximo aproximadamente 7 μm , como máximo aproximadamente 6 μm , como máximo aproximadamente 5 μm , como máximo aproximadamente 4 μm , como máximo aproximadamente 3 μm , como máximo aproximadamente 2 μm , o como máximo aproximadamente 1 μm) y / o al menos aproximadamente 0.1 μm (por ejemplo, al menos aproximadamente 0.2 μm , al menos aproximadamente 0.3 μm , al menos aproximadamente 0.4 μm , al menos aproximadamente 0.5 μm , al menos aproximadamente 0.6 μm , al menos aproximadamente 0.7 μm , al menos aproximadamente 0.8 μm , al menos aproximadamente 0.9 μm , al menos aproximadamente 1 μm , al menos aproximadamente 2 μm , o al menos aproximadamente 3 μm). Por ejemplo, el filtro puede tener un tamaño medio de poro que varía de aproximadamente 0.1 μm a

aproximadamente 100 μm (por ejemplo, de aproximadamente 0.1 μm a aproximadamente 40 μm , de aproximadamente 40 μm a aproximadamente 100 μm , de aproximadamente 3 μm a aproximadamente 6 μm , o de aproximadamente 0.1 μm a aproximadamente 0.3 μm).

En algunas realizaciones, la capa media se puede filtrar a través de una pluralidad de filtros conectados en serie entre sí, en la que el tamaño medio de poro de los filtros disminuye secuencialmente. Por ejemplo, la capa media se puede filtrar a través de un sistema de filtración que contiene tres filtros conectados en serie, en la que el primer filtro puede tener un tamaño medio de poro de aproximadamente 40 μm , el segundo filtro puede tener un tamaño medio de poro de aproximadamente 3 μm a aproximadamente 6 μm , y el tercer filtro puede tener un tamaño medio de poro de aproximadamente 0.1 μm a aproximadamente 0.3 μm . Un ejemplo de tal sistema de filtración es un sistema que contiene los filtros de profundidad secuenciales disponibles en el mercado de Pall Corporation (por ejemplo, que contiene los filtros de profundidad T2600, K200P y Bio10). Opcionalmente, el sistema de filtración puede incluir además un cuarto filtro (por ejemplo, que tiene un tamaño medio de poro de aproximadamente 0,2 μm) corriente abajo del tercer filtro. Un ejemplo del cuarto filtro es un filtro Sartobran P disponible de Sartorius Corporation.

En algunas realizaciones, los filtros utilizados para filtrar la capa media pueden tener una gran área de medio de filtración. Por ejemplo, los filtros pueden tener un área de medio de filtración de al menos aproximadamente 1 m^2 (por ejemplo, al menos aproximadamente 2 m^2 , al menos aproximadamente 4 m^2 , al menos aproximadamente 6 m^2 , o al menos aproximadamente 8 m^2).

En algunas realizaciones, después de que el tampón ácido y la clara de huevo se mezclan para formar una clara de huevo mezclada, la clara de huevo mezclado se puede filtrar sin la necesidad de permitir que los precipitados en la clara de huevo mezclada se asienten. En tales realizaciones, la clara de huevo mezclada (incluyendo los precipitados formados durante las etapas de adición/mezcla y la solución de clara de huevo restante) se puede filtrar sin ninguna separación previa de los precipitados de la clara de huevo mezclada. Por ejemplo, después de que el tampón ácido y la clara de huevo se mezclan, la clara de huevo mezclada se puede filtrar sin asentar mediante el uso de uno o más filtros descritos en el presente documento (por ejemplo, un sistema de filtración que contiene tres filtros conectados en serie que tienen tamaños de poro decrecientes). Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que, mediante la eliminación de una etapa de asentamiento, un método de este tipo puede reducir significativamente el tiempo y los costos para la preparación de clara de huevo

para procesamiento cromatográfico a granel y para el aislamiento de proteínas de la clara de huevo.

En algunas realizaciones, después de que el tampón ácido y la clara de huevo se mezclan para formar una clara de huevo mezclada, la clara de huevo mezclada se puede centrifugar para separar los precipitados (por ejemplo, complejos de ovomucina-lisozima) del sobrenadante. El sobrenadante obtenido así se puede filtrar mediante el uso de uno o más filtros descritos en el presente documento.

En general, la solución de clara de huevo filtrada se puede utilizar para aislar las proteínas recombinantes mediante el uso de cromatografía en columna, tales como cromatografía de intercambio iónico o cromatografía basada en interacción hidrófoba. Ejemplos de tales métodos cromatográficos se han descrito, por ejemplo, en la Publicación de la Solicitud de EE.UU. No. 2009/0299037.

En algunas realizaciones, esta divulgación presenta métodos de aislamiento de una proteína recombinante a partir de clara de huevo. Por ejemplo, tales métodos pueden incluir las etapas de: (1) proporcionar una piscina de clara de huevo que contiene una proteína recombinante, la piscina teniendo un volumen de al menos aproximadamente 10 litros; (2) ajustar el pH de la clara de huevo a partir de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.5, en donde la conductividad de la clara de huevo de pH ajustado es de aproximadamente 8 mS/cm a aproximadamente 20 mS/cm; (3) filtrar la clara de huevo para formar una solución; y (4) aislar la proteína recombinante en la clara de huevo por cromatografía en columna. La etapa de ajuste se puede realizar mediante la adición de una pequeña cantidad de un tampón ácido (por ejemplo, de aproximadamente 0.5% en peso a 5% en peso por kilogramo de clara de huevo) a la clara de huevo de la misma manera como se describió anteriormente. Las etapas de filtrado y aislamiento pueden ser realizadas por los métodos descritos en el presente documento o métodos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, esta divulgación presenta métodos de filtrado de la clara de huevo acidificada (por ejemplo, la clara de huevo acidificada por un tampón ácido descrito anteriormente). Por ejemplo, tales métodos pueden incluir las etapas de: (1) hacer pasar un tampón de pre-tratamiento que tiene una conductividad de entre aproximadamente 8 mS/cm y aproximadamente 20 mS/cm a través de un filtro; y (2) hacer pasar la clara de huevo (por ejemplo, que tiene un volumen de al menos aproximadamente 50 L) que tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.5 a través del filtro para obtener una clara de huevo filtrada. La clara de huevo filtrada puede utilizarse luego para aislar las proteínas recombinantes mediante el uso de cromatografía en columna. En

algunas realizaciones, el filtro usado en tales métodos puede ser similar a o el mismo que los descritos anteriormente. Por ejemplo, el filtro puede tener el mismo tamaño medio de poro (por ejemplo, de aproximadamente 0.1 μm a aproximadamente 100 μm) o área de medio filtración como las descritas anteriormente (por ejemplo, al menos aproximadamente 8 m^2).

En algunas realizaciones, el tampón de pre-tratamiento puede ser usado para mojar el filtro antes de pasar la clara de huevo (por ejemplo, la clara de huevo acidificada). El tampón de pre-tratamiento puede incluir una o más sales (por ejemplo, sales alcalinas). Sales ejemplares incluyen fosfato de sodio y cloruro de sodio. En algunas realizaciones, el tampón de pre-tratamiento puede incluir una combinación de fosfato de sodio y cloruro de sodio.

En general, el tampón de pre-tratamiento puede incluir un ácido. Ácidos ejemplares incluyen ácido acético, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido fluorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido cítrico, ácido bórico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido úrico, y ácido barbitúrico. En algunas realizaciones, una combinación de dos o más (por ejemplo, tres o cuatro) ácidos se puede usar en el tampón de pre-tratamiento.

En algunas realizaciones, el tampón de pre-tratamiento puede tener un pH sustancialmente el mismo que el pH de la clara de huevo. Por ejemplo, el tampón de pre-tratamiento puede tener un pH de al menos aproximadamente 5 (por ejemplo, al menos aproximadamente 5.2, al menos aproximadamente 5.4, al menos aproximadamente 5.6, al menos aproximadamente 5.7, al menos aproximadamente 5.8 o al menos aproximadamente 5.9) y/o como máximo aproximadamente 6.5 (por ejemplo, como máximo aproximadamente 6.4, como máximo aproximadamente 6.3, como máximo aproximadamente 6.2 o como máximo aproximadamente 6.1). En algunas realizaciones, el tampón de pre-tratamiento puede tener un pH de aproximadamente 6. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que el uso de un tampón de pre-tratamiento que tiene un pH sustancialmente el mismo que el pH de la clara de huevo para tratar un filtro puede ajustar el pH de la superficie del filtro para que sea similar al pH de la clara de huevo, minimizando de este modo la precipitación de la clara de huevo durante la filtración, lo cual puede causar obstrucción en el filtro u obstruir el flujo de las muestras que causa tensión de cizallamiento en el filtro, acortando seriamente por lo tanto la vida de uso del filtro.

Generalmente, el tampón de pre-tratamiento puede tener una conductividad compatible con la conductividad de la clara de huevo tal que la clara de huevo acidificada filtrada es compatible con las características de la cromatografía en

columna (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico) utilizada en los procesos de aislamiento/purificación corriente abajo. Por ejemplo, el tampón de pre-tratamiento puede tener una conductividad de al menos aproximadamente 8 mS/cm (por ejemplo, al menos aproximadamente 9 mS/cm, al menos aproximadamente 10 mS/cm, al menos aproximadamente 11 mS/cm, al menos aproximadamente 12 mS/cm, al menos aproximadamente 13 mS/cm, al menos aproximadamente 14 mS/cm, al menos aproximadamente 15 mS/cm, al menos aproximadamente 16 mS/cm, al menos aproximadamente 17 mS/cm, al menos aproximadamente 18 mS/cm) y/o como máximo aproximadamente 20 mS/cm (por ejemplo, como máximo aproximadamente 19 mS/cm, como máximo aproximadamente 18 mS/cm, como máximo aproximadamente 17 mS/cm, como máximo aproximadamente 16 mS/cm, en la mayoría aproximadamente 15 mS/cm, como máximo aproximadamente 14 mS/cm, como máximo aproximadamente 13 mS/cm, como máximo aproximadamente 12 mS/cm, o como máximo aproximadamente 11 mS/cm). Por ejemplo, el tampón de pre-tratamiento puede tener una conductividad de cualquier valor entre aproximadamente 8 mS/cm y aproximadamente 20 mS/cm. Los presentes inventores encontraron que el uso de un filtro sin ser tratado con el anterior tampón de pre-tratamiento para filtrar una solución de clara de huevo causaría que el filtro se obstruya rápidamente por los precipitados formados durante el proceso de filtración. Por otra parte, los presentes inventores encontraron inesperadamente que el uso de un tampón de pre-tratamiento que tiene la anterior conductividad para tratar un filtro puede ajustar la conductividad de la superficie del filtro para ser similar a la de la clara de huevo, minimizando de este modo la precipitación de la clara de huevo durante la filtración y aumentar significativamente el tiempo de vida del filtro.

En algunas realizaciones, la clara de huevo puede pasar a través de un filtro bajo una presión diferencial relativamente pequeña (por ejemplo, inferior a aproximadamente 30 psi, inferior a aproximadamente 25 psi, inferior a aproximadamente 20 psi, inferior a aproximadamente 15 psi, inferior a aproximadamente 12 psi, inferior a aproximadamente 10 psi, o inferior a aproximadamente 5 psi). Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que hacer pasar la clara de huevo a través de un filtro bajo una presión diferencial relativamente pequeña puede minimizar daños y/o obstrucción al filtro, lo que reduce los costos del producto ya que el filtro puede ser muy costoso.

El contenido de todas las publicaciones citadas en el presente documento (por ejemplo, patentes, publicaciones de solicitud de patente, y artículos) se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Ejemplo 1: Método de preparación de clara de huevo para procesamiento cromatográfico a granel que tiene una etapa de asentamiento

De cincuenta a cuatrocientos kilogramos de clara de huevo congelada almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en botellas Nalgene de 4L se descongeló a temperatura ambiente en baños de agua establecidos a $21 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 5 - 7 horas. Una vez cada hora, cada botella se retiró del baño de agua, inspeccionada visualmente para determinar el grado de deshielo, invertida repetidamente y colocada de nuevo en el baño de agua hasta que el deshielo era completo. Las botellas descongeladas se retiraron de los baños de agua y se almacenaron a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de que la última botella de clara de huevo se descongeló, la clara de huevo en las botellas se combinó en un recipiente de mezcla de tapa abierta. Se añadió un tampón ácido que contiene acetato de sodio 5.7 M a pH 4,0 (aproximadamente 1.3% peso/peso con respecto al peso de la clara de huevo) a la piscina de clara de huevo descongelada a 1 kilogramo por minuto, asegurando que la duración de la adición del tampón ácido no excediera 5 minutos, para obtener un pH objetivo final de 6.0 ± 0.1 a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla de clara de huevo se agitó continuamente durante 1 hora en el recipiente de mezcla de tapa abierta sin control de temperatura, y luego se decantó en un mezclador cerrado de un solo uso, refrigerado a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se mezcló durante 6 horas. Después de que la mezcla se detuvo, el precipitado se dejó sedimentar durante 6 horas. Si fuese necesario, el pH se ajustó adicionalmente a 6.0 ± 0.1 a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando acetato de sodio 5.7 M o de hidróxido de sodio 1 N, seguido por un mezclado adicional durante 1 hora y asentamiento durante 3 horas a temperatura ambiente (mezcla total y tiempo de asentamiento no superan las 24 horas). Una vez finalizado el asentamiento, la clara de huevo mezclada formó por tres capas, es decir, capas superior, media e inferior. A continuación, se colocó un tubo en la capa media y la capa media fue desviada o bombeada a través del tubo sin perturbar las capas superior e inferior. Los filtros (filtros de profundidad de Pall Corporation secuenciales, $40\text{ }\mu\text{m}$, $3-6\text{ }\mu\text{m}$, $0.1-0.3\text{ }\mu\text{m}$, respectivamente) se pre-enjuagaron con 80 litros de agua purificada por metro cuadrado de área de filtro para eliminar el carbono orgánico total, lixiviables, y extraíbles, y luego drenada. Los filtros pre-enjuagados se trataron a continuación con 1 volumen de retención de filtro de una solución tampón de pre-tratamiento que contiene fosfato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 140 mM a pH 6.0 y luego drenada. La solución de clara de huevo se decantó, evitando las partículas de clara de huevo agregadas y precipitadas asentadas, y se filtró a través de filtración sin salida a una velocidad de flujo de 1 litro por metro cuadrado por tipo de filtro o una presión diferencial

inferior a 30 psid para eliminar cualquier material precipitado no-asentado y se recogió en un mezclador de un solo uso estéril. A la finalización de la filtración de la clara de huevo, la clara de huevo retenida en el sistema de filtración se lavó abundantemente con un volumen de retención de tren de filtro de la solución tampón de pre-tratamiento que contiene fosfato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 140 mM a pH 6.0 para recuperar el producto y recogerlo en un mezclador de un solo uso estéril. La solución de clara de huevo filtrada se muestrea para la medición de la actividad enzimática y absorbancia ultravioleta (UV) y se almacenó a 2-8°C por hasta 24 horas antes de usarse para el aislamiento de proteínas recombinantes en la clara de huevo por medio de cromatografía en columna. La Tabla 1 muestra los resultados de la acidificación de la clara de huevo utilizando el tampón ácido descrito anteriormente (es decir, NaOAc 5.7 M, pH 4.0, y 1.3% peso/peso).

Tabla 1

	Promedio	
Peso Total (kg) de la Clara de Huevo Mezclada	83.52 ± 2.03	
pH Nativo	8.41 ± 0.06	
Conductividad Nativa (mS/cm)	8.47 ± 0.25	
5.7 M NaOAc, pH: 4.0 (mL)	1 ± 0.02	
% de NaOAc 5.7M añadido (p/p)	1.30%	
% de NaOAc 5.7M añadido (p/p)	1.20%	
Tiempo Posadición Bolo (min)	pH	Conductividad (mS/cm)
10	5.79 ± 0.03	9.52 ± 0.08
30	5.92 ± 0.02	9.45 ± 0.08
90	5.93 ± 0	9.48 ± 0.09
180	6.01 ± 0.01	9.48 ± 0.06
1080	6.09 ± 0.01	9.49 ± 0.09

Ejemplo 2: Método de preparación de clara de huevo para el procesamiento cromatográfico a granel sin una etapa de asentamiento

Cuatrocientos kilogramos de clara de huevo congelada (+/- 10%) de clara de huevo congelada (-20°C) se descongelaron a 2-8°C (en una cabina de cuarto frío) en aproximadamente 24 - 72 horas. La clara de huevo descongelada se combinó en un recipiente de mezcla cerrado de un solo uso con chaqueta y se mantuvo a 2-8°C. Se añadió un tampón ácido que contiene acetato de sodio 5.7 M

a pH 4.0 (1.08% peso/peso) a la clara de huevo descongelada a 1 kilogramo por minuto, asegurando que la duración de la adición del tampón ácido no excediera 5 minutos, para obtener un pH objetivo final de 6.0 ± 0.5 . La solución de clara de huevo acidificada se agitó continuamente durante 3 horas a 2-8°C. A continuación, la clara de huevo acidificada se calentó a $21 \pm 3^\circ\text{C}$ a través del tranque con chaqueta antes de la filtración. Los filtros (filtros de profundidad de Pall Corporation secuenciales, 40 μm , 3-6 μm , 0.1-0.3 μm , respectivamente) se pre-enjuago con 80 litros de agua purificada por metro cuadrado de área de filtro para eliminar el carbono orgánico total, lixiviables, y extraíbles. El agua purificada en el tren de filtro se desplazó con una solución tampón de pre-tratamiento que contiene fosfato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 140 mM a pH 6.0 hasta que la conductividad del efluente de filtro estaba dentro del rango de conductividad aceptable del tampón de pre-tratamiento (por ejemplo, 10 - 15 mS/cm). La clara de huevo acidificada homogéneamente mezclada se filtró a través de filtración sin salida a una velocidad de flujo de 1 litro/min/m² por tipo de filtro o resultando en una presión diferencial ≤ 10 psi para eliminar cualquier material precipitado o agregado. Se utilizó el volumen de efluente del filtro inicial igual al 80% del volumen de retención del tren de filtro para desplazar el tampón de pre-tratamiento y se descartó antes de la recogida del producto. El restante tampón de pre-tratamiento filtrado y la clara de huevo se recogieron en un mezclador de un solo uso estéril. A la finalización de la filtración de la clara de huevo, la clara de huevo retenida en el sistema de filtración se lavó con 1.5 volúmenes de retención de tren de filtro (0.5 de volúmenes de retención se recogen mientras que 1 volumen de retención permanece en el tren de filtración) de la solución tampón de pretratamiento que contiene fosfato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 140 mM a pH 6.0 para recuperar el producto y se recogió en el tanque de un solo uso estéril. La clara de huevo filtrada fue muestreada para medir la actividad enzimática y la absorbancia y se almacenó a 2-8°C durante un máximo de 24 horas antes de que se use para el aislamiento de proteínas recombinantes en la clara de huevo por medio de cromatografía en columna.

Ejemplo 3: Reducción de escala del proceso de fabricación de clara de huevo para evaluar la carga directa sobre el rendimiento de la filtración de profundidad y la robustez de la acidificación de la clara de huevo

Materiales

Todos los productos químicos utilizados para los estudios de Clarificación fueron de grado USP/MC. Las materias primas de clara de huevo se enumeran en la Tabla 2. Toda la materia prima se almacenó a -20 °C y se descongeló a 2-8°C

48-72 horas antes de su uso. La materia prima se combinó y se mantuvo a 2-8°C a través de la etapa de acidificación.

Tabla 2. Materias primas de clara de huevo

Corrida	Alicuota de Clara de Huevo (L)	Título (g/L)*	Cigrosidad
1	20	0.77	Homo
2	20	1.02	Homo
3	20	0.79	Homo

* Basado en actividad enzimática

Para todas las preparaciones tampón, se llevaron a cabo mediciones de conductividad utilizando medidores de pH/conductividad con temperatura compensada a 25°C. El pH de los tampones fue medido a 20°C. Las formulaciones de preparación de tampón en proceso se enumeran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Formulación de tampón

	Tampón	Materia prima	g/L	Especificaciones	
				pH	Cond (mS/cm)
Acidificación de clara de huevo	Acetato de Sodio 5.7 M, pH 4.0	Acetato de Sodio Trihidrato	136.1	4.0 ± 0.1	36.0 ± 5.0
		Ácido Acético Glacial	285.0		
Enjuague de Filtro/Equilibrado	Fosfato de Sodio 20 mM, NaCl 140mM, pH 6.0)	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2.24	6.0 ± 0.1	16.0 ± 2.0
		Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1.02		
		NaCl	8.18		
Lavado 1	Fosfato de Sodio 5 mM, pH 6.0	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2.24	6.0 ± 0.1	0.45 ± 0.15
		Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1.02		
Lavado 2	Tris 5 mM, NaCl 1 M, pH 7.2	Base Tris	0.61	7.2 ± 0.1	88.0 ± 5.0
		NaCl	58.44		
Lavado 3	Tris 5 mM, NaCl 0.25 M,	Base Tris	0.61	7.2 ± 0.1	23.0 ± 3.0
		NaCl	14.61		

	pH 7.2				
Elución	Tris 5 mM, AIP 17%, pH 7.2	Base Tris	0.61	7.2 ± 0.1	< 2.0
		Alcohol Isopropílico	133.0		
Lavado Ácido	Ácido Fosfórico 0.85%	Ácido Fosfórico	16.9	N/A	N/A

Equipos de Proceso

Los patines de proceso (Exploradores AKTA) eran servicio (mantenimiento preventivo) de GE healthcare. Los equipos de proceso (chasis Pall Stax y Exploradores AKTA) fueron mantenidos por personal de Synageva PD durante todo el estudio de caracterización. La Tabla 4 a continuación enumera todos los equipos de hardware usados en este Ejemplo.

Tabla 4. Lista de equipos

Etapa	Descripción del Equipo	Fabricante	Parte No.
General	Accumet XL550 medidor de pH/conductividad	Fisher Scientific	X13-12005
	Báscula de Mesa 3.2kg	Mettler Toledo	ML3002E
	Báscula de Piso 50kg	Ohaus	CD-33
	Bomba Masterflex L/S (10-600 rpm)	Cole-Parmer	7523-60
	Masterflex I/P 73 C-flex	Cole Parmer	06427-73
	Masterflex L/S 24 Bioprene	Cole Parmer	06508-24
Clarificación	Chasis Stax Pilot	Pall	SXLSC02W
	Chasis Stax Pilot	Pall	SXLSC02W
	Bomba Masterflex I/P (33- 600 rpm)	Cole-Parmer	77410-10
	Celda de Flujo de Presión	SciLog	080-696-PSX-5
	Monitor de Presión SciPres	SciLog	080-690
	Báscula de Piso 250kg	Ohaus	CD-33
PHIC SDM	Explorador AKTA	GE Healthcare	29001622
	Columna XK16	GE Healthcare	N/A
A280	Nanodrop 2000	Thermo Scientific	N/A

Etapa	Descripción del Equipo	Fabricante	Parte No.
SDS-PAGE	Mini-PROTEAN TGX 4%-20%	Bio-Rad	456-1096 (L/N: 400091244)
	Patrones de Color Dual Plus de precisión	Bio-Rad	161-0374 (L/N: 35001785)
	Celda Tetra Mini PROTEAN	Bio-Rad	165-8000

El chasis Pall STAX (PN# SXLSC02W) se instalaron usando los filtros de profundidad STAX enumerados en la Tabla 5 en la siguiente configuración (40 μm , 3-6 μm y 0,1-0,3 μm) y un filtro de 0,2 μm adicional Sartobran P.

Chasis #1: (inferior) Colector \rightarrow T2600 \rightarrow Placa de ventilación (superior)

Chasis #2: (inferior) Colector \rightarrow K200P \rightarrow Placa de ventilación \rightarrow Colector \rightarrow Bio10 \rightarrow Placa de ventilación (superior)

Cada filtro se intercala entre un colector de 1.5" de entrada/salida (P/N: 7.008.225) y una placa de ventilación superior. Se determinó el volumen de retención de cada filtro individual empíricamente durante el flujo inicial de agua.

Tabla 5. Equipo de filtración de profundidad

Corrida	Filtro	Relación de Carga (L/m ²)	Tamaño de Poro (μm)	Filtros Stax (S.A. m ²)	Vol de Retención (L)
1	T2600	20	40	1.0	6.5
	K200P	20	3-6	1.0	6.0
	BIO10	20	0.1-0.3	1.0	5.5
	Sartobran P	160	0.22	1.8	1.35
2	T2600	20	40	1.0	6.5
	K200P	20	3-6	1.0	6.0
	BIO10	40	0.1-0.3	0.5	3.8
	Sartobran P	160	0.22	1.8	1.35
3	T2600	20	40	1.0	6.5
	K200P	20	3-6	1.0	6.0
	BIO10	40	0.1-0.3	0.5	4.0
	Sartobran P	160	0.22	1.8	1.35

Las columnas XK 16/20 (GE Healthcare) se utilizaron para todos los empaques de columna de la cromatografía de interacción hidrofóbica de fenilo

(PHIC, por su sigla en inglés). Toda la cromatografía se realizó en un explorador AKTA equipado con la versión de software Unicorn 5.31 (GE Healthcare).

Procedimientos

Antes de iniciar la etapa de clarificación, las alícuotas de clara de huevo congelada (un total de 20 L) se descongelaron a 2-8°C durante 48-72 horas. La clara de huevo descongelada se combinaron en un tanque de polipropileno de tamaño apropiado (25 L) con el papel protector estéril (Thermo Scientific / Hyclone P/N 343050-0005). La clara de huevo combinada fue mezclada hasta la homogeneidad utilizando un mezclador superior (330 rpm) a 2-8°C. A continuación, la clara de huevo combinada fue acondicionada al pH objetivo a través de la adición de acetato de sodio 5.7 M a pH 4,0. La Tabla 6 muestra el volumen de acetato de sodio 5.7 M añadido para cada corrida de clarificación para alcanzar el pH objetivo. El pH se controló durante más de 2 horas para asegurar que el pH objetivo se lograra.

Tabla 6. Acidificación de clara de huevo combinada

Corrida	Volumen de la Piscina (L)	pH Objetivo	Vol. Acetato 5.7 M (mL)	Acetato 5.7 M (% p/p)	Acetato 5.7 M (% v/v)	pH Inicial	pH Final	Tiempo de Acidificación (h)
1	20	6.0	180	0.94	0.90	N/A	5.94	18
2	20	5.7	245	1.27	1.22	8.11	5.67	24
3	20	6.3	164	0.83	0.80	8.21	6.25	6

Antes de la filtración, los filtros se enjuagaron individualmente con 80 L/m² con agua RO/DI filtrada. Durante el enjuague con agua, el volumen de retención para cada filtrada fue determinado empíricamente. Al terminar el enjuague con agua, los filtros se sondearon en un tren continuo y se enjuagaron con 16 L/m² de tampón de equilibrado de PHIC (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 6.0). El enjuague del tampón terminó cuando el pH y la conductividad del efluente cumplieron las especificaciones del tampón de enjuague (por ejemplo, pH 6.0±0.1, conductividad 16.0±2.0). La clara de huevo combinada se cargó en el tren de filtro usando un tubo de inmersión de 3/8" (tubo I/P 73 Cole) a 1.0 L/min con mezcla continua (mezclador superior, 300 rpm). Se recogió el 80% del volumen de retención medido, acumulativo (~ 13.2 L) y dirigido a los residuos. El filtrado fue entonces recogido en un recipiente de tamaño adecuado separado hasta que el precipitado de baja densidad congelado entró en el tubo de inmersión. Después el tren de filtración se enjuagó con 1.5 volúmenes de retención (~ 25 L) con un

tampón de equilibrado de tampón. El filtrado final se mezcló bien mediante una paleta de tanque limpio para asegurar la homogeneidad antes del muestreo. El filtrado se almacenó a 2-8°C durante la noche antes de la separación PHIC.

Antes de la separación PHIC, el filtrado almacenado a 2-8°C se calentó utilizando un baño de agua a temperatura ambiente. El filtrado se filtró en segundo lugar a través de un cartucho Sartobran 150 (0.45um/0.22um, P/N 5231307H4-00) para generar la carga de PHIC final. La Tabla 7 enumera los tampones y los parámetros en proceso utilizados.

Tabla 7. Etapas de operación unitaria de cromatografía PHIC

Etapa	Tampón	CV	Velocidad Linear (cm/h)	Velocidad de Flujo (mL/min)
Equilibrado	Fosfato de Sodio 20mM, NaCl 140mM, pH 6.0	5	120 cm/h	4.02
Carga			60 cm/h	2.01
Lavado 1	Fosfato de Sodio 5mM, pH 6.0	8	120 cm/h	2.01 (1CV) 4.02 (7CV)
Lavado 2	Tris 5mM, NaCl 1M, pH 7.2	8	120 cm/h	4.02
Lavado 3	Tris 5mM, NaCl 0.25M, pH 7.2	4	120 cm/h	4.02
Pre-Elución	Tris 5mM, AIP 17%, pH 7.2	UV→ 40mAU	120 cm/h	4.02
Fracción 1	Tris 5mM, AIP 17%, pH 7.2	UV → 800mAU	120 cm/h	4.02
Elución	Tris 5mM, AIP 17%, pH 7.2	1.9	120 cm/h	4.02
Post Elución	Tris 5mM, AIP 17%, pH 7.2	2.0	120 cm/h	4.02
Tira	RO/DI	5	60 cm/h Flujo ascendente	2.01
Lavado Ácido	Ácido Fosfórico 0.85%	3	60 cm/h Flujo	2.01

Etapa	Tampón	CV	Velocidad Linear (cm/h)	Velocidad de Flujo (mL/min)
			ascendente	
Enjuague con Agua	RO/DI	5	60 cm/h Flujo ascendente	2.01
CIP	NaOH 0.5N	3	60 cm/h Flujo ascendente (Retención 1h)	2.01
Enjuague con Agua	RO/DI	5	60 cm/h Flujo ascendente	2.01
Almacenamiento	Etanol 20%	3	60 cm/h Flujo ascendente	2.01

Resultados y discusión

(1) Carga directa de la clara de huevo acidificada (es decir, sin etapa de asentamiento)

Inicialmente, se llevó a cabo una corrida de punto central único ("Corrida 1"; escala 1:20; 20 L de clara de huevo acidificada a un pH de aproximadamente 6) para evaluar el impacto de la carga directa (sin asentamiento, ración de carga de 20 L/m²) en el rendimiento de la filtración de profundidad con el fin de establecer un modelo a escala experimental representativo. Para cada filtro (es decir, T2600, K200P, Bio10), aunque la presión de alimentación de entrada en el filtro se incrementó linealmente a lo largo de la carga de clara de huevo acidificada, la presión diferencial no excedió 10 psid. Además, la presión de alimentación no aumentó aún más durante el enjuague de tampón y exhibió una disminución dramática en el filtro T2600. Estos resultados sugieren que la carga directa de la clara de huevo acidificada a los filtros no bloqueó significativamente los filtros durante esta corrida.

Los resultados de la recuperación de proteína se resumen en la Tabla 8 a continuación. Como se muestra en la Tabla 8, la recuperación de proteína después de la etapa de clarificación cumplió con la expectativa objetivo (> 70%).

Tabla 8. Recuperación de proteína después de la clarificación

Corrida 1	Resultados Prom. Aju (U/mL)	Volumen (mL)	Proteína Recuperada (mg)
Piscina de Clara de Huevo	199.5	20000	15344.6
Piscina de Clara de Huevo Acidificada	253.4	20000	19493.6
Piscina de Clara de Huevo Clarificada	122.8	32700	15438.2
Rendimiento Etapa Clarif* (Clara de Huevo Descongelada)			100.6%
Rendimiento Etapa Clarif* (Clara de Huevo Acidificada)			79.2%

* Basado en Actividad Enzimática

El rendimiento de la columna de PHIC de la Corrida 1 era comparable a los resultados obtenidos de corridas incluyendo una etapa de asentamiento de la clara de huevo acidificada. Además, la pureza de las proteínas se midió mediante un análisis de SDS-PAGE usando 4-20% de gel de Tris-glicina. Las fracciones de eluyente de PHIC de la Corrida 1 no revelaron diferencias en el patrón de bandas en comparación con corridas incluyendo una etapa de asentamiento. Estos datos sugirieron que la carga directa de la clara de huevo acidificada durante la clarificación (es decir, la filtración) no tuvo impacto en la recuperación de proteínas o en el rendimiento de PHIC en términos de rendimiento y pureza.

Los resultados anteriores sugieren que la clara de huevo acidificada se puede cargar directamente a los filtros durante la etapa de clarificación sin pasar por una etapa de asentamiento. A continuación, este método se aplicó a las corridas de estudio de Robustez (es decir, Corridas 2 y 3) descritas en la siguiente sección.

(2) La robustez de la acidificación de la clara de huevo

Una diseño experimental de 2 factores, 2 niveles (alto/bajo, baja/alta) se utilizó para evaluar la robustez de la etapa de acidificación de la clara de huevo. Las condiciones experimentales se definen en la Tabla 6. En la Corrida 2, la acidificación se llevó a cabo durante 24 horas para lograr un pH final de 5.67 (es decir, aproximadamente 5.7). En la Corrida 3, la acidificación se llevó a cabo durante 6 horas para lograr un pH final de 6.25 (es decir, aproximadamente 6.3). Los resultados muestran que ambas corridas exhibieron aumentos de presión de

alimentación lineales comparables y presiones máximas de alimentación debido al aumento del ensuciamiento del T2600. Se observó una presión de alimentación máxima más baja en la Corrida 2, la cual se cree que es debido a una correlación entre el pH de la clara de huevo y la viscosidad de la clara de huevo (es decir, menor pH de la clara de huevo resulta en menor viscosidad de la clara de huevo). En ningún caso la presión de alimentación excedió 10 psig, mostrando un rendimiento comparable al de la Corrida 1.

Después de la etapa de clarificación, las recuperaciones de proteína en las Corridas 2 y 3 fueron, respectivamente, 71% y 83%, lo que cumplió con las expectativas objetivo de (es decir, $\geq 70\%$) y fueron comparables con la Corrida 1 (es decir, 79%). Después de la separación PHIC, los rendimientos de proteína en las Corridas 2 y 3 fueron, respectivamente, 59% y 68%, los cuales fueron comparables con los obtenidos de las corridas incluyendo una etapa de asentamiento. Las superposiciones de cromatogramas comparando las Corridas 2 y 3 ambas con la Corrida 1 confirmaron el rendimiento de la columna comparable.

Los resultados anteriores sugieren que la variación del pH de acidificación y el tiempo no dieron lugar a ningún impacto negativo significativo en relación con la actividad enzimática o el rendimiento. Por lo tanto, la etapa de clarificación fue robusto cuando se realiza dentro de los dos rangos de prueba (es decir, pH de acidificación 5.7-6.3 y tiempo de acidificación de 6-24 horas).

(3) Estabilidad en proceso de la clara de huevo

Se realizaron estudios de retención de proceso para definir los tiempos de retención máximos para siguientes tres puntos de retención de operación unitaria: (1) clara de huevo descongelada (2-8°C), (2) clara de huevo acidificada (2-8°C y temperatura ambiente), y (3) clara de huevo aclarada (2-8°C y temperatura ambiente). La estabilidad del producto (en términos de actividad enzimática) se evaluó en un período de tiempo de 72 - 96 horas. Se realizaron dos estudios de estabilidad independientes para evaluar el impacto sobre la varianza del parámetro de aclaración sobre los tiempos de retención de producto en las etapas de clara de huevo acidificada y aclarada. Se tomaron alícuotas Sesenta mL (dos para cada uno de clara de huevo acidificada y aclarada) de cada uno de los dos experimentos de robustez anteriores (es decir, las Corridas 2 y 3) y almacenadas a 2-8°C o temperatura ambiente. Muestras de 1.5 ml se tomaron cada 24 horas ya fuera hasta 72 horas (pH 5.7/24 horas) o 96 horas (pH 6.3/6 horas). Por falta de tiempo, un estudio de estabilidad no se llevó a cabo en la Corrida 1 (punto central). Los parámetros de diseño de estabilidad se resumen en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9. Diseño de estabilidad en proceso

Punto de Retención	Objetivo de Proceso Comercial (hr)	Temp de Retención Comercial (°C)	Parámetros de Estudio			
			Temp de Estudio (°C)	pH	Tiempo de Acidificación (h)	Tiempo de Retención (h)
Clara de huevo congelada	72 – 96	2-8	2-8	N/A	N/A	0 – 168*
			2-8	N/A	N/A	
Clara de huevo acidificada	6 hr (Rango de 6 – 24 hr)	2-8	2-8	5.7–6.3	6-24	0–72 (24h)
			TR**			0 – 96 (6h)
Clara de huevo clarificada	≤ 6 hr (sin refiltración) ≤ 24 hr (con refiltración)	TR o 2-8	2-8	5.7–6.3	6-24	0–72 (24h)
			TR**			0 – 96 (6h)

* T=0 equivale al comienzo de la Descongelación (tiempo de retención adicional incluyendo el tiempo de descongelación)

** TR=18-25°C (Promedio: 22°C)

Los resultados muestran que la actividad enzimática de los tres puntos de retención en proceso (clara de huevo descongelada, acidificada, y aclarada) se mantuvo estable durante la totalidad del tiempo de estudio (hasta 96 horas) a 2-8°C. Además, la variación ya fuera del pH de acidificación o el tiempo de acidificación en general no impactó negativamente en la actividad enzimática. Un único conjunto de parámetros de ensayo (pH 5.7, temperatura ambiente) para el punto de retención de clara de huevo acidificada exhibió una disminución de ~20% en la actividad enzimática. Sin embargo, el objetivo de almacenamiento de proceso comercial actual para la clara de huevo acidificada es 2-8°C y, por lo tanto, esta observación no es un riesgo para el proceso comercial. Basándose en los datos, la clara de huevo descongelada/combinada fue estable durante hasta 168 horas (incluyendo el tiempo inicial de descongelación de 72 horas) a 2-8°C, la clara de huevo acidificada fue estable hasta 96 horas a 2-8°C y la etapa de clara de huevo clarificada fue estable hasta 96 horas a 2-8°C o temperatura ambiente.

(4) Estudio de aclaramiento de ADN suplementario

Aunque la clara de huevo en sí no contiene ADN, el proceso de recolección de clara de huevo puede resultar en la presencia de ADN genómico anfitrión a través de la introducción de cantidades menores de yema de huevo en la piscina de clara de huevo. La clara de huevo acidificada y aclarada derivada de los estudios de las Corridas 1-3 anteriores se analizaron para determinar ADN genómico anfitrión. Los análisis revelaron lo siguiente:

1. Se detectó ADN en la clara de huevo acidificada y combinada
2. Se identificó un aclaramiento de ADN significativo durante la etapa de Clarificación.

Estos datos sugirieron que, además del aclaramiento de la proteína anfitrión de la clara de huevo, la etapa de clarificación proporciona un medio para eliminar el ADN genómico anfitrión de la piscina de producto.

Otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.