

Método y kit de purificación de proteínas

Campo técnico

Esta descripción se refiere a un método y a un kit para combinar captura/purificación e inactivación vírica de una alimentación que comprende una proteína de interés.

Antecedentes de la invención

Con el creciente número de proteínas candidatas terapéuticas, especialmente anticuerpos monoclonales (mAbs) que entran en diversas etapas de desarrollo, las compañías biofarmacéuticas están buscando cada vez más soluciones innovadoras que les permitan llevar este pipeline a buen término.

Para el desarrollo del proceso de fabricación de anticuerpos, mantener los atributos de calidad deseados mientras se reduce el plazo de comercialización, manteniendo la rentabilidad, y proporcionando flexibilidad de fabricación son los problemas clave en el mercado competitivo actual. Puesto que las terapias de anticuerpos pueden requerir grandes dosis durante un largo período de tiempo, la sustancia del fármaco debe ser producida en grandes cantidades con eficiencia de costo y tiempo para cumplir los requisitos clínicos y para allanar el camino hacia la comercialización. Este es también el caso de otras proteínas terapéuticas recombinantes que incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión, enzimas terapéuticas y fragmentos de anticuerpos.

En general, las proteínas se producen mediante cultivo celular, utilizando líneas celulares, líneas celulares bacterianas o virus diseñados para producir la proteína de interés. Las líneas celulares se alimentan con un medio de crecimiento complejo que comprende azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento. Para uso como un agente terapéutico humano, una cantidad o muestra de alimento (por ejemplo, la cosecha de cultivos celulares no clarificados), incluyendo las moléculas diana o la proteína diana expresada por las células cultivadas, debe tratarse para (i) inactivar ciertos de los virus potencialmente presentes y (ii) purificar y separar la proteína deseada de la mezcla de compuestos con que se alimentan las células y de los subproductos de las mismas células. En general, (i) y (ii) son pasos separados del proceso de purificación de proteínas deseado. En la mayoría de los procesos de fabricación contemporáneos, la proteína de interés se purifica primero y luego se trata por separado para inactivar los virus que se encuentran potencialmente contenidos en la alimentación.

Tales métodos se conocen a partir de WO 2009/058812 A1 (D1) y Valdes et al. (2002) (D2). D1 describe un método para la purificación de anticuerpos basado en cromatografía de intercambio catiónico. La alimentación de anticuerpos purificados resultante se puede tratar subsiguientemente con el fin de inactivar los virus presentes en el alimento. De manera similar, D2 describe un método para la purificación de proteínas y la inactivación vírica basada en la purificación por afinidad de un anticuerpo diana en una columna de cromatografía de afinidad de proteína A seguida de un tratamiento con bajo pH del eluato para inactivar las partículas virales restantes. Aunque realizar la purificación de proteínas y la inactivación vírica en pasos separados es una práctica aceptada, esta consume tiempo y conduce a un número incrementado de operaciones y tiempo para su ejecución.

Es el objeto de esta descripción describir un método y un kit que supere al menos parte de los inconvenientes mencionados anteriormente. Por lo tanto, se describen un método y un kit para combinar la captura/purificación de proteínas y la inactivación vírica.

Breve descripción de la invención

En un primer aspecto, se describe un método para combinar inactivación y purificación vírica de una alimentación que contiene una proteína de interés de acuerdo con la reivindicación 1.

Más en particular, dicho método describe:

- (a) poner en contacto la alimentación con partículas o medios cargados negativamente,
- (b) acondicionar las partículas o medios de manera que su pH sea ácido durante un tiempo suficiente después del contacto para inactivar uno o más virus presentes en dicha alimentación, y
- (c) eluir dicha proteína de interés a partir de dicho dispositivo de separación.

En una realización, se describe un método para la inactivación y purificación del virus combinado de una alimentación que contiene una proteína de interés, que comprende las etapas de:

- acondicionar la alimentación para tener una conductividad inferior a 15 mS/cm y un pH de al menos 3,
- poner en contacto la alimentación con partículas o medios cargados negativamente,
- acondicionar las partículas o los medios para que tengan un pH inferior a 4,5 y mantener el pH durante por lo menos 5 minutos,
- acondicionar las partículas o los medios de manera que su conductividad sea de por lo menos 5 mS/cm y el pH sea de 5 a 8, con lo que se eluye la proteína de interés.

En un segundo aspecto, se describe un kit para combinar la inactivación y purificación vírica de una alimentación que contiene una proteína de interés que contiene por lo menos partículas o medios cargados negativamente, se describen soluciones adecuadas para acondicionar las partículas o medios y/o la alimentación y al menos un documento que comprende instrucciones para el usuario.

El método y el kit o esta descripción presentan varias ventajas, entre las cuales se encuentra la simplificación del proceso de purificación de proteínas al fusionar dos pasos separados en un solo paso y reducir el riesgo de contaminación del producto final, es decir, la proteína de interés.

Esto conduce a una disminución del tiempo de producción y de los costos, disminuyendo así el costo del producto final. Además, el método descrito ofrece la opción de procesamiento subsiguiente continuo de la cosecha de cultivo celular ya que carece de un conjunto separado de inactivación viral. En particular, el método proporciona ventajas para el procesamiento subsiguiente de la cosecha de cultivos celulares en donde no es aplicable una etapa de captura de afinidad y la captura de la molécula diana se realiza por cromatografía de intercambio catiónico. En comparación con los métodos que

implican etapas de afinidad en combinación con una elución de pH bajo e inactivación viral por lotes, el método descrito puede reducir el contenido de agregados, e incluso evitar la agregación de las moléculas diana. Esto se deriva de realizar el paso de inactivación del virus mientras que la molécula de interés se une a las partículas o medios de separación de intercambio catiónico. El método descrito aumenta considerablemente el rendimiento de purificación/inactivación combinadas y la calidad de las moléculas purificadas.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra un diagrama de flujo que comprende tres pasos de un método para combinar inactivación con purificación vírica de una alimentación que contiene una proteína de interés de acuerdo con una realización de la invención.

La figura 2 muestra un diagrama de flujo de un método para combinar inactivación y purificación v

írica de una alimentación que contiene una proteína de interés de acuerdo con una realización de la invención.

La figura 3 muestra un electroforegrama de SDS-PAGE de una fracción de lavado y una fracción de proteína diana obtenida de acuerdo con el método de la invención.

La figura 4 muestra un electroforegrama de SDS-PAGE de fracciones de lavado y una fracción de proteína diana obtenida de acuerdo con el método de la invención.

Descripción detallada de la invención

Se describen un método y un kit para combinar inactivación y purificación víricas de una alimentación que comprende proteínas de interés tales como anticuerpos, moléculas derivadas de anticuerpos, proteínas de fusión, enzimas, etc..

A menos que se defina lo contrario, todos los términos usados en la presente descripción, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado que un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención entiende sin dificultad. Por medio de una orientación adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor las enseñanzas de la presente descripción.

Los siguientes términos utilizados en este contexto tienen los siguientes significados:

Los términos “un”, “uno/a”, y “el/la”, tal como se utilizan en la presente, se refieren tanto al singular como al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A manera de ejemplo, “un compartimiento” se refiere a uno o más de un compartimiento.

“Aproximadamente”, tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares para abarcar variaciones de +/-20% o menos, preferiblemente +/-10% o menos, más preferiblemente +/-5% o menos, aún más preferiblemente +/-1% o menos, y todavía más preferiblemente +/-0,1% o menos de y a partir del valor especificado, en la medida en la que dichas variaciones resulten adecuadas para la ejecución de la invención

descrita. Sin embargo, se debe entender que el valor al que el modificador "aproximadamente" se refiere en sí también se describe de manera específica.

"Comprender", "que comprende" y "comprende" y "compuesto de", según se utiliza en la presente, son sinónimos de "incluir", "incluyendo", "que incluye", "incluye" o "contener", "que contiene", "contiene" y son términos inclusivos o abiertos que especifican la presencia de lo que sigue, por ejemplo, componente, y no excluyen ni exceptúan la presencia de componentes, características, elementos, partes, o pasos adicionales no enunciados, conocidos en la técnica o descritos en la misma.

La cita de rangos numéricos por puntos finales incluye todos los números y las fracciones incluidas dentro de ese rango, así como los puntos finales citados.

La expresión "% en peso" (porcentaje en peso), aquí y a lo largo de la descripción, a menos que se defina de otra manera, se refiere al peso relativo del componente respectivo con base en el peso total de la formulación. La expresión "1% w/w" se refiere a lo que se puede entender como 1g del componente respectivo por 100g de la formulación, la expresión "1% p/v" se refiere a lo que se podría entender como 1g del componente respectivo por 100 mL de la formulación, la expresión "1% v/v" se refiere a lo que se puede entender como 1 mL de componente respectivo por 100 mL de la formulación.

En un primer aspecto, un método para combinar inactivación y purificación vírica de una alimentación que contiene una proteína de interés comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto la alimentación con partículas o medios cargados negativamente,
- (b) acondicionar las partículas o medios de manera que su pH sea ácido durante un tiempo suficiente después del contacto para inactivar uno o más virus presentes en dicha alimentación, y
- (c) eluir dicha proteína de interés a partir de dichas partículas o dichos medios.

Los dispositivos de separación son dispositivos utilizados para separar ciertas impurezas de las proteínas diana buscadas. Estos dispositivos incluyen columnas de cromatografía o cartuchos con partículas o medios envasados en los mismos. En esta descripción, el acondicionamiento de las partículas o los medios puede ocurrir antes o después de poner en contacto la alimentación con aquellas partículas o medios de separación cargados negativamente. El método permite la purificación de una proteína de interés a partir de una alimentación y la inactivación simultánea de partículas de virus que puedan estar

contenidas en esa alimentación. Por una parte, las partículas o medios de separación se unen selectivamente a la proteína de interés, permitiendo que las moléculas no diana sean eliminadas de la alimentación asegurando así que, tras la elución del dispositivo de separación, se obtenga una proteína de interés con un alto grado de pureza. Este alto grado de pureza facilita además el procesamiento subsiguiente del eluato que comprende la proteína de interés. Por otra parte, la inactivación de las partículas víricas que podrían estar presentes en la alimentación es a menudo esencial para la utilidad de la proteína de interés. El método permite la purificación de una proteína de interés y la inactivación ácida simultánea de partículas virales que podrían unirse a las partículas o los medios de separación además de la proteína de interés. Esto conduce a la elución de la proteína de interés en un estado purificado con un contenido disminuido de impurezas y sin ciertas partículas virales activas que son sensibles a la inactivación viral ácida que podría comprometer el uso adicional de la proteína de interés. Realizar estos dos pasos de procesamiento como un solo paso permite, por lo tanto, agilizar aún más el proceso de purificación, lo que lo hace más eficiente y consume menos tiempo.

La proteína de interés puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un derivado de anticuerpo o una proteína de fusión. La proteína de interés puede ser también cualquier otra proteína recombinante tal como una enzima, un péptido o un polipéptido u otras biomoléculas expresadas por las células.

En una realización, antes del paso (a) el pH de dicha alimentación se ajusta de manera que se encuentre por debajo del punto isoelectrónico (pI) de dicha proteína de interés. En otra realización adicional, la alimentación se acondiciona hacia una conductividad preferida. De preferencia, dicha conductividad es de 25 mS/cm.

Se debe entender que el acondicionamiento de la conductividad del alimento y/o el pH se puede lograr mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica incluyendo dilución, intercambio de tampón, valoración o cualquier combinación de los mismos. El acondicionamiento de las partículas o la conductividad de los medios y el pH se logra haciendo fluir a través de dichas partículas o dichos medios un volumen suficiente de una solución que tenga la conductividad y/o el pH diana. Un acondicionamiento para disminuir la conductividad de una alimentación podría lograrse diluyendo el alimento con agua ultrapura o con una solución amortiguadora baja en sal tal como acetato de sodio 20 mM pH 5.3. Podría lograrse un acondicionamiento para procurar incrementar la conductividad de una alimentación mediante titulación de la alimentación con solución de cloruro de sodio 5M hasta alcanzar la conductividad

deseada. El pH de una solución podría disminuirse utilizando una solución de ácido clorhídrico 0,2M a 1,0M o ácido acético 1M. El pH de una solución podría aumentarse utilizando un hidróxido sódico 0,2M a 1,0M o con TRIS 2M base pH 9,50.

En una realización, la alimentación se acondiciona antes del paso (a), de manera que la conductividad de dicha alimentación sea de por lo menos 0,1 mS/cm, por lo menos 2 mS/cm, por lo menos 3 mS/cm, por lo menos 4 mS/cm, por lo menos 5 mS/cm o cualquier valor intermedio. La conductividad de la alimentación es como máximo 25 mS/cm, como máximo 13 mS/cm, como máximo 12 mS/cm, como máximo 10 mS/cm, como máximo 7 mS/cm, como máximo 6 mS/cm, 5,5 mS/cm o cualquier valor intermedio. La alimentación que comprende una proteína de interés también está acondicionada antes del paso (a) de tal manera que el pH de la alimentación se encuentre por debajo del punto isoeléctrico (pI) de dicha proteína de interés. El pH de la alimentación es de al menos 3, al menos 4, al menos 4,5, al menos 5 y como máximo 9, como máximo 8, como máximo 7, como máximo 6 o cualquier valor intermedio. El acondicionamiento de la alimentación antes del paso (a) conduce a una carga superficial positiva neta de la proteína o molécula de interés y/o a una conductividad que favorece la unión de dicha molécula a las partículas o medios, en particular partículas o medios de intercambio catiónico. El acondicionamiento asegura la captura adecuada de la proteína de interés e incrementa la capacidad de unión dinámica de las partículas o los medios.

En una realización adicional, el método comprende los pasos de:

- acondicionar la alimentación de manera que su conductividad sea como máximo de 15 mS/cm y su pH sea de al menos 3,
- poner en contacto la alimentación con partículas o medios de separación cargados negativamente, uniéndola así a la proteína de interés a las partículas o los medios de separación,
- acondicionar las partículas o los medios de separación de manera que su pH sea ácido [máximo 4,5] y mantener dicho pH durante al menos 1 minuto, o al menos 5 minutos, inactivando así los virus,
- acondicionar las partículas o los medios de separación de manera que su conductividad sea de al menos 5 mS/cm y su pH sea de 5 a 8, con lo que se eluye la proteína de interés.

Los inventores han encontrado que las condiciones anteriormente mencionadas eran especialmente favorables para la buena unión de la proteína de interés a las partículas

o los medios de separación, por una parte, y para la inactivación simultánea del virus por otra parte.

Para el propósito de la presente descripción, una alimentación es cualquier material o solución que comprenda la proteína deseada. Preferiblemente, la alimentación es por lo menos una cosecha de cultivo celular que se puede obtener cultivando células en por lo menos un recipiente de cultivo celular tal como un biorreactor hasta alcanzar un punto predeterminado del proceso. Una alimentación es una muestra o una cantidad de una cosecha de cultivo celular. Una alimentación o una cosecha de cultivo celular se clarifica opcionalmente antes de ser tratada por el método descrito.

En una realización alternativa, el método comprende además el paso de clarificación de la alimentación antes del paso (a). Cuando la alimentación es una cosecha de cultivo celular, dicha clarificación podría llevarse a cabo cuando el cultivo celular está dentro y/o fuera del recipiente o biorreactor de cultivo celular. La clarificación se puede lograr mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica.

En el caso de que la alimentación sea una cosecha de cultivo celular desarrollada en un entorno de suspensión, la clarificación de la alimentación no clarificada que comprende un cultivo celular comienza con la determinación del peso celular húmedo (WCW) del cultivo celular cultivado en suspensión. El WCW se puede determinar de acuerdo con cualquier método conocido por la persona experta en la técnica. El WCW se puede determinar como sigue: las alimentaciones de cultivo celular se retiran del biorreactor después de alcanzar la densidad celular predeterminada. En una realización, se recogen al menos 3 alimentaciones de 15 a 50 ml cada una. Las alimentaciones se centrifugan entre 4000 a 5000 g durante 5 a 10 minutos para sedimentar las células. El sobrenadante obtenido se desecha y el WCW se calcula con base en la diferencia entre el peso de los tubos centrífugos vacíos y el peso de los tubos centrífugos que contienen células sedimentadas. Se calcula el promedio de las tres mediciones y se registra como el WCW en gramos por litro.

La clarificación de la alimentación no clarificada que comprende un cultivo celular comprende la adición a dicho cultivo de un ácido graso que tiene de 7 a 10 átomos de carbono, alantoína, al menos un compuesto electropositivo, tierra de diatomeas (DE) o cualquier combinación de los mismos. Estos compuestos podrían estar en forma líquida o sólida y podrían ser introducidos como una mezcla o separados los unos de los otros.

0,3% a 0,6% v/v de ácido graso de 0,5% a 3% p/v de alantoína y 0,01% a 1% p/v de al menos un compuesto electropositivo se pueden usar para la clarificación de la alimentación. En otra o en más realizaciones, dichos ácido graso de 0,4% a 0,5% p/v, 1% a 2% p/v de alantoína y 0,05% a 0,1% p/v de al menos un compuesto electropositivo se utilizan para la clarificación de la alimentación. El peso molecular del quitosano puede ser de 30 kDa a 1000 kDa. Dicho quitosano podría tener cualquier grado de acetilación.

En una realización, el compuesto electropositivo es cualquier partícula cargada electropositiva tal como polisacárido electropositivo, polímero electropositivo, quitosano, derivados de quitosano, polímeros sintéticos tales como cloruro de polidialil dimetilamonio (pDADMAC o polyDDA), poli (alilamina) benzilada y polietilenimina, partículas disponibles comercialmente como TREN (BioWorks, WorkBeads TREN, alto) o tensioactivos catiónicos como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (también conocido como CTAB).

En otra realización, la fórmula estructural general del ácido graso es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, en donde n es un número entero de 4 a 12 inclusive, o de 5 a 8 inclusive. El ácido graso puede ser ácido enantoico (ácido heptanoico), ácido caprílico (ácido octanoico), ácido pelargónico (ácido nonanoico), ácido cáprico (ácido decanoico), ácido nonenoico o cualquier combinación de los mismos. El ácido graso se puede añadir en forma de una sal, tal como una sal sódica, por ejemplo, caprilato sódico. La porción grasa del ácido graso puede consistir de una cadena lineal "recta" de átomos de carbono. En algunas realizaciones, la porción grasa del ácido graso puede consistir de una cadena ramificada, tal como ácido 2-etilhexanoico, que contiene una cadena de 2 carbonos en la posición del número 2 de la cadena primaria de 6 carbonos, produciendo un total de 8 átomos de carbono. El ácido graso puede incluir un doble enlace en cualquier posición en la cadena de carbono. La cadena de ácidos grasos puede contener 6 o 7 u 8 ó 9 átomos de carbono.

En otra realización, el ácido graso, la alantoína y el al menos un compuesto electropositivo se añaden al cultivo celular dentro del biorreactor y se dejan en dicho biorreactor durante 5 a 360 minutos, durante 15 a 240 minutos, durante 60 a 120 minutos, durante 30 a 60 minutos, o durante un intervalo intermedio. El cultivo celular se agita a entre 60 a 120 rpm a temperatura ambiente o por encima de la temperatura ambiente hasta aproximadamente 37°C.

En otra realización adicional, la DE se agrega al cultivo celular después de la adición del ácido graso, la alantoína y el compuesto electropositivo y la agitación en las condiciones mencionadas anteriormente. La cantidad de DE añadida es del 20 al 60%, del 25 al 45%,

o del 30 al 48%, del 35 al 45%, o aproximadamente el 40% del WCE del cultivo celular. La DE puede ser de varios grados que están disponibles comercialmente en el mercado. Por ejemplo, para cultivos de células CHO, se puede usar el grado Celpure 300® o el grado Celpure 1000®, dependiendo del biorreactor.

En una realización, se puede agregar DE después de 45 minutos contados a partir de la adición del ácido graso, la alantoína y el compuesto electropositivo. Después de la adición de DE, la agitación se mantiene durante 5 a 60 min, durante 8 a 40 min, durante 10 a 30 min, durante 15 a 20 min. La agitación se mantiene entre 60 a 180 rpm. El cultivo celular se filtra a continuación utilizando al menos un medio de filtración que sea impermeable a la DE. Dicho medio de filtración es al menos parcialmente permeable a por lo menos algunos componentes del cultivo celular sin clarificar, tales como pequeñas impurezas de células huésped, y es totalmente permeable a las proteínas o moléculas de interés.

Tras la introducción del cultivo celular en el medio de filtración, la DE se acumula en un lado del medio de filtración y se convierte gradualmente en una estructura de DE que comprende una pluralidad de canales. El tamaño o el diámetro de los canales se define por el tamaño de las partículas de la DE añadida a la primera solución. El tamaño de las partículas de DE puede seleccionarse de acuerdo con el tamaño de la biomolécula de interés y/o las propiedades del cultivo celular y/o las propiedades de las células usadas para expresar la molécula de interés (esto incluye el tipo de células (por ejemplo, células CHO) y la densidad celular de la cosecha a ser clarificada). La estructura de DE formada sirve como herramienta de filtración. El material grande tal como células, restos celulares y moléculas no-diana se retienen por la estructura de DE, mientras que las biomoléculas diana, que tienen un tamaño pequeño, fluyen a través de los canales de la estructura de DE. Se obtiene así un cultivo celular clarificado que comprende la proteína de interés. Opcionalmente, un filtro de profundidad se coloca corriente abajo de la estructura de DE y el medio de filtración. El filtro de profundidad se elige de manera que la proteína de interés pase a través de este mientras retiene otros contaminantes o impurezas eventuales. Esto reduce además la presencia de contaminantes en el cultivo celular clarificado. La clarificación de la alimentación o del cultivo celular utilizando DE mejora la capacidad de filtración de las células cultivadas tratadas/floculadas mediante la eliminación, al menos parcial, de las impurezas de las células y otras moléculas no diana de la alimentación.

Las partículas o los medios cargados negativamente pueden ser una resina de intercambio catiónico. Dichas partículas o dichos medios pueden ser medios o partículas de cromatografía de intercambio catiónico. Dichos medios o dichas partículas pueden envasarse en una columna o utilizarse como una membrana comercialmente disponible en el mercado. Además, dichos medios de cromatografía, columna o membrana, pueden ser de naturaleza multimodal con propiedades de intercambio catiónico, por ejemplo intercambiadores de cationes tolerantes a sales, intercambiadores de cationes con restos hidrófobos, etc. Dicha columna se prepara para su uso preferiblemente de acuerdo con el manual del proveedor. Después de la preparación, dicha columna puede acondicionarse para tener parámetros, es decir, pH y conductividad, iguales, similares o cercanos a los parámetros de la alimentación que contiene la molécula diana. Los medios de cromatografía pueden ser un intercambiador de cationes denominado "fuerte" así como un intercambiador de cationes denominado "débil". Las partículas o medios de separación también pueden ser una membrana de separación que comprenda grupos funcionales o el así llamado adsorbente de membrana. De preferencia, dichas partículas o dichos medios se empacan en una columna o un cartucho.

La alimentación clarificada y acondicionada se pone posteriormente en contacto con las partículas o los medios. Esto se puede lograr introduciendo la alimentación en una columna de cromatografía rellena con partículas o medios o poniéndola en contacto con las partículas o los medios. El contacto entre la alimentación clarificada y las partículas o medios se puede realizar manual o automáticamente utilizando tubos y/o bombas adecuadas y/o un instrumento cromatográfico.

Como las moléculas no diana podrían unirse a las partículas o los medios, se realiza opcionalmente al menos una etapa de lavado. La etapa de lavado se puede realizar antes y/o después de la etapa de inactivación vírica del método. En una realización adicional, las partículas o medios de separación se lavan:

- introduciendo en las partículas o los medios la solución utilizada para equilibrarlas, y/o
- acondicionando las partículas o los medios de manera que su conductividad se encuentre por debajo de la conductividad de elución de la proteína, de 7 a 15 mS/cm y/o acondicionando su pH a un pH que esté por debajo del pH de elución de la proteína, de 3 a 8. Este Lavado elimina las moléculas no diana de las partículas o los medios de separación mientras se mantiene la proteína de interés

unida a dichas partículas o dichos medios de separación. Esto aumenta la pureza de la proteína de interés que se ha de eluir en un paso posterior.

En una realización, las partículas o los medios durante la inactivación vírica se acondicionan para tener un pH bajo, inactivando de esta manera los virus presentes en la alimentación. Adicionalmente, la disminución del pH de las partículas o los medios de separación resulta en una carga neta positiva incrementada de las proteínas de interés debido a la ganancia de protones (H^+) del entorno ácido. Esto garantiza el aclaramiento viral de la fracción que se va a eluir y la captura/purificación por cromatografía en contraste con enfoques conocidos en los que los dos pasos se realizan por separado. El pH de las partículas/medios de separación se reduce preferiblemente utilizando una solución amortiguadora adecuada. Dicho pH se reduce de manera que es al menos 2, al menos 2,5, al menos 3, al menos 3,4, al menos 3,6 o cualquier valor intermedio. Dicho pH es como máximo 4,5, como máximo 4,3, como máximo 4, como máximo 3,9, como máximo 3,8, como máximo 3,7 o cualquier valor intermedio. La disminución del pH de las partículas o los medios de separación conduce a la inactivación de los virus presentes en la alimentación. El pH bajo de las partículas o medios de separación se mantiene durante al menos 1 minuto, al menos 15 minutos, al menos 25 minutos, al menos 35 minutos, al menos 45 minutos, al menos 60 minutos o cualquier valor intermedio. Dicho pH bajo se mantiene como máximo durante 4 horas, como máximo 3 horas, como máximo 2 horas, como máximo 1 hora o cualquier valor intermedio. El pH bajo de las partículas o los medios de separación se puede mantener deteniendo completamente o manteniendo un caudal bajo a través de las partículas o los medios de separación. El caudal puede variar dependiendo del proceso y puede ser de 0 a 600 cm/h. El caudal puede ser de como máximo 600 cm/h, como máximo 500 cm/h, como máximo 400 cm/h, como máximo 300 cm/h o cualquier valor intermedio. Dicho caudal es de al menos 50 cm/h, al menos 100 cm/h, al menos 150 cm/h, al menos 200 cm/h o cualquier valor intermedio. Opcionalmente, se añade al menos un agente que facilite el aclaramiento viral a la solución amortiguadora utilizada durante el paso de inactivación viral. La concentración del agente para facilitar el aclaramiento viral es de 0,01 a 10% v/v, de 1 a 8% v/v, de 3 a 7% v/v, aproximadamente 5% v/v y el agente de inactivación viral preferido es alcohol isopropílico. Adicionalmente, la solución de lavado de inactivación viral también puede contener tritón X-100 y fosfato de tri-n-butilo o cualquier combinación de los mismos para facilitar el aclaramiento viral.

En una realización, después de la inactivación del virus, se mantiene constante la conductividad de las partículas/medios de separación, es decir, como máximo 7 mS/cm

y como mínimo 0,1 mS/cm, mientras que su pH se ajusta a un pH de 3 a 9, de 6 a 8, de 5 a 8. El ajuste del pH sirve para (i) preparar la elución de la proteína de interés mientras se mantiene dicha proteína unida a las partículas o los medios de separación.

De hecho, la elución en condiciones de pH neutro reduce considerablemente el riesgo de agregación de la proteína de interés que tiende a agregarse bajo condiciones ácidas y (ii) conseguir una mayor pureza de la proteína, ya que las impurezas que permanecen en las partículas o los medios de separación se eluyen debido al cambio del pH, mientras que la proteína de interés permanece unida a las partículas o los medios de separación. Esto aumenta la pureza de la proteína de interés que será eluida.

Posteriormente, las partículas o los medios de separación se acondicionan de manera que su conductividad sea al menos 1 mS/cm, al menos 5 mS/cm, al menos 7 mS/cm al menos 7,5 mS/cm, al menos 8 mS/cm, al menos 9 mS/cm y al menos 10 mS/cm. Dicha conductividad es de aproximadamente 50 mS/cm, a lo sumo 20 mS/cm, a lo sumo 14 mS/cm a lo sumo 13 mS/cm, a lo sumo 12 mS/cm y a lo sumo 11 mS/cm. Esto conduce a la elución de la proteína de interés en un estado purificado y sin contenido o con contenido disminuido de impurezas y/o agregados.

En un segundo aspecto, un kit para combinar inactivación con purificación víricas de una alimentación que contenga una proteína de interés contiene por lo menos una partícula o un medio de separación cargado negativamente, que puede envasarse en una columna, soluciones adecuadas para acondicionar las partículas o los medios de separación y/o la alimentación como se describe anteriormente y al menos un documento que comprende instrucciones para el usuario.

Las figuras 1 y 2 muestran diagramas de flujo de métodos de acuerdo con las realizaciones de la descripción. El diagrama de flujo de la figura 1 muestra el esquema general del concepto. En el primer paso a, la proteína de interés presente en una alimentación se une a partículas de separación o medios que están cargados negativamente. En el paso b, los virus presentes en la alimentación son inactivados mediante el acondicionamiento de las partículas o los medios de manera que se alcanza un pH ácido, lo que permite también la unión de la proteína a las partículas o los medios de separación. Finalmente, la proteína de interés se eluye en un paso c).

La figura 2 ilustra los pasos de la posible metodología. En un primer paso 1, se proporciona una alimentación no clarificada que en el paso 2 se clarificará opcionalmente mediante eliminación de materia particulada. En un paso opcional 3, la alimentación se

preacondiciona hacia una conductividad y/o pH preferidos. La alimentación se pone entonces en contacto con las partículas/medios de separación que se envasan normalmente en una columna o un cartucho. En un paso posterior (paso 6), las partículas/medios de separación se acondicionan hacia un pH ácido. Este pH permitirá la unión de la proteína de interés, pero también puede inactivar cualquier virus presente en la alimentación. Obsérvese que cualquiera de los pasos 2 y 6 se puede realizar antes del otro, dependiendo de la realización. Opcionalmente, en los pasos 5 y 7, se pueden realizar lavados para eliminar moléculas no diana. En un paso final 8, la proteína se eluirá de las partículas o los medios, dando como resultado una proteína de interés purificada.

Ejemplos

Ejemplo 1: purificación de anticuerpos monoclonales IgG1 e inactivación del virus de roedores a partir de una alimentación de cultivo de células CHO.

El anticuerpo monoclonal IgG1 se purificó a partir de una alimentación de cultivo de células CHO con base en un método de acuerdo con una posible realización. La figura 2 ilustra la secuencia de pasos durante la purificación e inactivación del virus del anticuerpo monoclonal IgG1. La cosecha no clarificada de cultivo de células CHO (Figura 2P – Paso 1) se trató con ácido caprílico (0,45% v/v), alantoína (1% p/v), quitosano de alto peso molecular (0,08% p/v) y tierra de diatomeas de grado Celpure 300© (38% p/p de células húmedas) y clarificada (Figura 2 – Paso 2) mediante filtración de alimentación del cuerpo con tierra de diatomeas a un pH de 5.30. El cultivo celular expresó el anticuerpo monoclonal IgG1 con un punto isoelectrico teórico de 8,61.

Después de la clarificación anterior, la cosecha se clarificó adicionalmente con un filtro de profundidad Sartoclear DL20. La cosecha clarificada se diluyó hasta una conductividad de 5 mS/cm con agua ultrapura (Figura 2 – Paso 3). El pH de la cosecha clarificada se ajustó a 5,3 con ácido acético 1M (Figura 2 – Paso 3). Un medio de intercambio catiónico fuerte Toyoppearl Gigaacap S-650 M, preenvasado en una columna de cromatografía de volumen de columna (CV) de 5 ml, con dimensiones de lecho de 8 mm x 100 mm, como medio de captura/inactivación vírica, y se aplicó el siguiente procedimiento:

- la columna de cromatografía se desinfectó con hidróxido de sodio 0,5N durante 60 minutos con un caudal de 100 cm/h y luego se neutralizó con HEPES 50 mM pH 7,0, 5 CV A 600 cm/h;

- El medio de intercambio catiónico se acondicionó con acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 1M pH 5,30 para 10 CV con un caudal lineal de 600 cm/h;
- El medio de intercambio catiónico se equilibró con acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio con conductividad de 5.0 mS/cm, pH 5.3 para 10 CV a un caudal de 600 cm/h;
- La cosecha clarificada que contenía la proteína de interés se cargó a la columna a 600 cm/h (Figura 2 – Paso 4);
- El medio de intercambio catiónico se lavó (lavado 1, Figura 2 – Paso 5) con un tampón de equilibrio: acetato sódico 50 mM, cloruro sódico con una conductividad de 5,0 mS/cm para 5 CV a un caudal de 600 cm/h;
- La inactivación vírica se llevó a cabo (lavado 2, Figura 2 – Paso 6) pasando una solución de acetato sódico 50 mM, pH 3,70 a través del medio de intercambio catiónico a 100 cm/h durante 60 minutos;
- se lavó el medio de intercambio catiónico (lavado 3, Figura 2 – Paso 7) con el tampón de equilibrio: acetato sódico 50 mM, cloruro sódico con una conductividad de 5,0 mS/cm para 5 CV a un caudal de 600 cm/h;
- El medio de intercambio catiónico se lavó (lavado 4) con acetato sódico 50 mM, cloruro sódico, conductividad de 11 mS/cm, pH 5,30 para 7 CV a un caudal de 600 cm/h;
- la proteína de interés se eluyó (Figura 2 – Paso 8) con acetato sódico 50 mM, cloruro sódico, conductividad de 14,5 mS/cm, pH 5,30 a un caudal de 150 cm/h;
- El medio de intercambio catiónico se separó con acetato de sodio 50 mM, NaCl 1M, pH 5,30 para 5 CV a un caudal de 600 cm/h;
- El medio de intercambio catiónico se desinfectó con NaOH 0,5N durante 60 minutos con un caudal de 100 cm/h y se almacenó en HEPES 50 mM, etanol al 20% v/v pH 7,0.

La proteína de interés se eluyó y se recogió en diferentes fracciones que se analizaron. La concentración de proteína diana en la fracción que fluía se monitoreó utilizando la prueba Fc-ELISA y los resultados fueron negativos tanto en cada fracción recogida como en el pool que fluía. Las fracciones de lavado y las fracciones de elución se analizaron mediante SDS-PAGE (Fig. 3) que confirmó que las fracciones de lavado (carril 1 en la Fig. 3) contienen principalmente impurezas de bajo peso molecular (LMW) y un porcentaje muy pequeño de la proteína de interés. La fracción de elución (carril 2, Fig. 3) contenía el anticuerpo diana. El carril 3 de la Figura 3 muestra una tira y el carril 10 de la Figura 3 muestra un marcador de peso molecular. El contenido de las proteínas de

la célula huésped en la fracción de elución se ha monitoreado utilizando el kit HCP ELISA disponible comercialmente de Cygnus Technologies, y se estimó que la concentración de HCP en la fracción de elución es de aproximadamente 500 ppm.

Ejemplo 2: purificación de anticuerpos monoclonales IgG1 e inactivación vírica a partir de una alimentación de cultivo de células CHO.

El anticuerpo monoclonal IgG1 se purificó a partir de una alimentación de cultivo de células CHO con base en un método de acuerdo con una realización de la invención. La Figura 2 ilustra la secuencia de pasos durante la purificación e inactivación del virus del anticuerpo monoclonal IgG1. La cosecha no clarificada de cultivo de células CHO (Figura 2 – Paso 1) se trató con ácido caprílico (0,45% v/v), alantoína (1% p/v), quitosano de alto peso molecular (0,08% p/v) y tierra de diatomeas de grado Celpure 300 (38% p/p de peso de células húmedas) y se clarificó (Figura 2 – Paso 2) por filtración de alimentación del cuerpo con tierra de diatomeas a pH de 5.30. El cultivo celular expresó el anticuerpo monoclonal IgG1 con un punto isoeléctrico teórico de 8,61.

Después de la clarificación anterior, la cosecha se clarificó adicionalmente con filtro de profundidad Millipore BIHC. La alimentación clarificada se diluyó a una conductividad de 5 mS/cm con agua ultrapura (Figura 2 – Paso 3). El pH de la cosecha clarificada se ajustó a 5,3 con ácido acético 1M (Figura 2 – Paso 3). Se usó un medio de intercambio catiónico Toyopearl GigaCap S-650M, preenvasado en una columna de cromatografía de volumen de columna (CV) de 5 ml, con dimensiones de lecho de 8 mm x 100 mm, como medio de captura/inactivación vírica, y se aplicó el siguiente procedimiento:

- la columna de cromatografía se desinfectó con hidróxido de sodio 0,5N durante 60 minutos con un caudal de 100 cm/h y luego se neutralizó con HEPES 50 mM pH 7,0, 5 CV A 600 cm/h;
- el medio de intercambio catiónico se acondicionó con acetato de sodio 30 mM, NaCl 1M, pH 5,30 para 10 CV a un caudal de 600 cm/h;
- el medio de intercambio catiónico se equilibró con acetato sódico 30 mM, cloruro sódico con una conductividad de 5,0 mS/cm, pH 5,30 para 10 CV a un caudal de 600 cm/h;
- La cosecha clarificada que contenía la proteína de interés se cargó a la columna a 600 cm/h (Figura 2 – Paso 4);
- el medio de intercambio catiónico se lavó (lavado 1, Figura 2 – Paso 5) con un tampón de equilibrio, acetato sódico 30 mM, cloruro sódico con una conductividad de 5,0 mS/cm para 5 CV a un caudal de 600 cm/h;

- el medio de intercambio catiónico se lavó (lavado 2, Figura 2 – Paso 5) con acetato sódico 30 mM, cloruro sódico con conductividad de 11 mS/cm, pH 5,3 para 7 CV con caudal lineal de 600 cm/h;
- se realizó la inactivación vírica (lavado 3, Figura 2 – Paso 6) pasando 30 mM de acetato sódico, cloruro sódico con conductividad 5 mS/cm, pH 3,7 durante 45 minutos con caudal lineal de 100 cm/h;
- El medio de intercambio catiónico se lavó (Figura 2 – Paso 7) con HEPES 30 mM, cloruro sódico con conductividad de 5 mS/cm, pH 7,2 para 6 CV con una velocidad de flujo de 600 cm/h;
- la proteína de interés se eluyó (Figura 2 – Paso 8) con HEPES 20 mM, cloruro sódico 1M, conductividad de 12 mS/cm, para 4 CV con un caudal lineal de 150 cm/h;
- el medio de intercambio catiónico se separó con HEPES 20 mM, cloruro sódico 1M, pH 7,2 para 5 CV a una velocidad de flujo lineal de 600 cm/h;
- el medio de intercambio catiónico se desinfectó con hidróxido sódico 0,5N durante 60 minutos con un caudal de 100 cm/h y se almacenó en HEPES 50 mM, etanol al 20% v/v pH 7,0.

La proteína de interés se eluyó y se recogió en diferentes fracciones que se analizaron. La concentración de proteína diana, es decir el anticuerpo, en la fracción que fluía se monitoreó utilizando la prueba Fc-ELISA y los resultados fueron negativos tanto en cada fracción recogida como en el pool que fluía. Las fracciones de lavado y las fracciones de elución se analizaron mediante SDS-PAGE (Fig. 4) lo que confirmó que las fracciones de lavado (carriles 1 y 2 en la Fig. 4) contienen principalmente impurezas de bajo peso molecular (LMW) y un porcentaje muy pequeño de la proteína de interés. La fracción de elución (carril 3, Fig. 4) contenía el anticuerpo diana. El carril 4 de la Figura 4 muestra una tira y el carril 10 de la Figura 4 muestra un marcador de peso molecular. El contenido de las proteínas de la célula huésped en la fracción de elución se ha monitoreado utilizando el kit HCP ELISA disponible comercialmente de Cygnus Technologies, y se estimó que la concentración de HCP en la fracción de elución es de aproximadamente 500 ppm.

Se supone que la presente invención no se limita a ninguna forma de realización descrita anteriormente y que se pueden agregar algunas modificaciones al ejemplo presentado sin una nueva evaluación de las reivindicaciones adjuntas.