

Método para incubar líquidos e inactivar virus

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para incubar líquidos, a un método para preparar un fármaco biofarmacéutico y a un dispositivo para la preparación de un fármaco biofarmacéutico.

ANTECEDENTES

En muchos procedimientos de funcionamiento continuo, se mezclan líquidos y luego se incuban haciéndolos pasar a través de equipos de procesamiento tales como tubos o columnas. Sin embargo, cuando pasan a través de una estructura que se usa en el procedimiento, las partes del líquido que están más cerca de la superficie de la estructura tienden a fluir a una velocidad menor que las partes del líquido que están más lejos de la superficie de la estructura. Por ejemplo, cuando una mezcla líquida fluye a través de un tubo hueco, las partes del líquido en el centro del tubo tienden a fluir a mayor velocidad que las partes del líquido en la periferia. Como resultado, diferentes partes del líquido tienen diferentes tiempos de residencia, incluso cuando todas las partes del líquido entran en la estructura al mismo tiempo. Dicho de otro modo, las diferentes partes del líquido muestran una distribución de tiempos de residencia. Si hay una gran diferencia en el flujo a lo largo del tiempo entre las diferentes partes del líquido, la distribución de tiempo de residencia es amplia; si hay una diferencia pequeña en el flujo a lo largo del tiempo entre las diferentes partes del líquido, la distribución de tiempo de residencia es estrecha.

Una distribución de tiempo de residencia estrecha resulta ventajosa cuando han de incubarse mezclas líquidas durante un periodo de tiempo definido. Por ejemplo, en un procedimiento de producción de productos biofarmacéuticos continuo, puede lograrse la inactivación de virus continua mezclando un líquido que contiene un producto biofarmacéutico con agentes de inactivación de virus e incubando la mezcla haciéndola pasar a través de una estructura usada en el procedimiento durante un periodo de tiempo definido. Una distribución de tiempo de residencia estrecha permite que todas las partes del líquido de la mezcla se incuben con el agente de inactivación de virus durante un periodo de tiempo similar, es decir el deseado. De este modo, podrían evitarse que algunas partes del líquido se expongan al agente de inactivación de virus durante demasiado tiempo, lo que podría dañar el fármaco biofarmacéutico, mientras que otras partes del líquido no se exponen al agente de inactivación de virus durante el tiempo suficiente, lo que podría conducir a inactivación de virus incompleta.

Los métodos conocidos actualmente para incubar líquidos que fluyen no proporcionan una distribución de tiempo de residencia estrecha, o adolecen de otros inconvenientes graves. Por ejemplo, el enfoque más sencillo para incubar una mezcla líquida en un procedimiento de producción continuo sería hacerla pasar a

través de un tubo hueco que sea suficientemente largo como para proporcionar el tiempo de residencia mínimo deseado. Sin embargo, la distribución de tiempo de residencia en un tubo hueco es extremadamente amplia e irreproducible. Podrían añadirse mezcladores estáticos al tubo para promover el mezclado radial (referencia 1). Sin embargo, para tal configuración, la ampliación a escala puede ser un problema así como la instalación de mezcladores estáticos en tramos de tubo largos.

Alternativamente, los denominados inversores de flujo helicoidales (CFI) funcionan haciendo pasar una mezcla líquida a través de un tubo helicoidal que tiene curvas adicionales de 90° (referencia 2). Se supone que esta configuración aumenta el mezclado radial a la vez que minimiza el mezclado axial, estrechando de ese modo la distribución de residencia. El sistema se ha descrito recientemente para el uso en inactivación de virus continua (referencias 3, 4), y la misma configuración se ha usado recientemente para estrechar la distribución de tiempo de residencia en una etapa de precipitación de impurezas (referencia 5). Sin embargo, se ha demostrado que el CFI sólo funciona con diámetros de tubo de 2-3 mm, y la ampliación a escala sigue siendo un reto porque la dinámica de fluidos en el sistema cambia con las dimensiones del tubo. El CFI también está limitado a un único caudal para cada diseño dado.

Recientemente, se ha sugerido segmentar una corriente de producto en un microrreactor introduciendo un medio de separación inmiscible para la inactivación de virus continua con distribución de tiempo de residencia estrecha (referencia 6). Sin embargo, un método de este tipo está limitado al uso de microrreactores, lo que hace que la ampliación a escala sea muy difícil.

Debido a la falta descrita anteriormente de métodos adecuados para incubar líquidos que fluyen con una distribución de tiempo de residencia estrecha, la incubación sensible al tiempo actual a menudo se realiza en modo discontinuo en lugar de en modo continuo. En el modo discontinuo, la mezcla líquida se incuba en un recipiente mientras que el flujo se interrumpe durante el tiempo de incubación. Como resultado, la productividad (por ejemplo en lo que se refiere a la cantidad de líquido incubado por periodo de tiempo, o en lo que se refiere a la cantidad de un fármaco biofarmacéutico producido por periodo de tiempo) en modo discontinuo generalmente es menor que la productividad en modo continuo.

En vista de lo anterior, hay una gran demanda de métodos mejorados que permitan incubar líquidos a lo largo de un periodo de tiempo definido, a la vez que proporcionen una alta productividad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención satisface las necesidades descritas anteriormente y resuelve los problemas mencionados anteriormente en la técnica proporcionando las realizaciones descritas a continuación:

En particular, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que hacer pasar un líquido a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados proporciona una distribución de tiempo de residencia más estrecha que los métodos conocidos anteriormente. Por tanto, según la invención, puede incubarse una mezcla de al menos dos líquidos mezclando dichos al menos dos líquidos, y haciendo pasar la mezcla a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados, en el que el mezclado y el paso se llevan a cabo de manera continua.

Los inventores también han descubierto que la estructura que tiene múltiples canales interconectados puede ser un lecho de relleno de perlas no porosas. En esta realización, los canales interconectados están formados por los espacios entre las perlas no porosas. Los inventores realizaron entonces numerosos experimentos para descubrir qué propiedades afectan a la distribución de tiempo de residencia. Los inventores descubrieron sorprendentemente que el diámetro medio de partícula y la distribución del tamaño de partícula de las perlas que forman el lecho de relleno tienen el mayor impacto sobre la distribución de tiempo de residencia en el intervalo sometido a prueba. Específicamente, los inventores descubrieron que dicho lecho de relleno de perlas no porosas proporciona una distribución de tiempo de residencia particularmente estrecha cuando las perlas tienen un diámetro medio de partícula en el intervalo de 0,05 mm a 1 mm, y cuando la distribución del tamaño de partícula es estrecha. Además, los inventores han descubierto que volúmenes más grandes de los lechos de relleno de perlas no porosas dan como resultado distribuciones de tiempo de residencia más estrechas. Además, según la invención, lechos de perlas más largos (por ejemplo en forma de columnas) también dan como resultado distribuciones de tiempo de residencia más estrechas.

A diferencia de muchos métodos usados actualmente, los métodos de la presente invención pueden ampliarse a escala fácilmente. Esto se debe a que el método de la presente invención no es muy sensible a los cambios en los caudales y las velocidades lineales superficiales, y a que la distribución de tiempo de residencia se hace más estrecha cuando se usan lechos de relleno de perlas no porosas que tienen volúmenes más grandes y son más largos. Por tanto, el método de la presente invención puede integrarse fácilmente en procedimientos de producción comerciales.

En general, la presente invención proporciona medios mejorados para incubar líquidos al proporcionar las realizaciones preferidas descritas a continuación:

1. Un método para incubar una mezcla de al menos dos líquidos, comprendiendo el método:
 - i) mezclar dichos al menos dos líquidos para obtener una mezcla; y
 - ii) hacer pasar dicha mezcla a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados, incubando de ese modo dicha mezcla.

2. El método según el punto 1, en el que el método es un método de flujo continuo.
3. El método según el punto 1 ó 2, en el que dichos mezclado y paso se llevan a cabo de manera continua.
4. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que la estructura que tiene múltiples canales interconectados es un lecho de relleno de perlas no porosas.
5. El método según el punto 4, en el que las perlas no porosas son perlas no porosas inertes.
6. El método según el punto 4 o el punto 5, en el que las perlas no porosas son perlas de vidrio, o perlas de cerámica, o perlas de plástico tal como perlas de PMMA, o perlas de acero.
7. El método según uno cualquiera de los puntos 4 a 6, en el que el diámetro medio de partícula de las perlas no porosas está en el intervalo de 0,05-1 mm, preferiblemente en el intervalo de 0,05-0,6 mm, más preferiblemente de 0,05 a 0,5 mm, y lo más preferiblemente en el intervalo de 0,05-0,3 mm.
8. El método según uno cualquiera de los puntos 4 a 7, en el que el 95% de las perlas no porosas no se desvían del diámetro medio de partícula en más del 50%, preferiblemente no más del 35%, lo más preferiblemente no más del 20%.
9. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en el que la estructura que tiene múltiples canales interconectados tiene una longitud de al menos 5 cm, o al menos 10 cm, o al menos 20 cm, o al menos 30 cm, o al menos 50 cm, o al menos 70 cm, o al menos 100 cm.
10. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en el que la estructura que tiene múltiples canales interconectados tiene una longitud de al menos 20 cm.
11. El método según uno cualquiera de los puntos 4 a 10, en el que el lecho de relleno de perlas no porosas puede obtenerse mediante un método que comprende someter dichas perlas no porosas a un tratamiento de vibración.
12. El método según uno cualquiera de los puntos 4 a 11, en el que para el lecho de relleno de perlas no porosas, la fracción del volumen de vacíos con respecto al volumen total está en el intervalo de 0,2 a 0,45.
13. El método según uno cualquiera de los puntos 4 a 12, en el que para el lecho de relleno de perlas no porosas, la fracción del volumen de vacíos con respecto al volumen total está en el intervalo de 0,37 a 0,42.
14. El método según uno cualquiera de los puntos 4 a 13, en el que el lecho de relleno de perlas no porosas está contenido en una columna y/o un reactor.
15. El método según el punto 14, en el que la columna tiene un diámetro de más de 5 mm, preferiblemente un diámetro de al menos 10 mm.

16. El método según uno cualquiera de los puntos 4 a 15, en el que el volumen de vacío del lecho de relleno de perlas no porosas es de al menos 10 ml, preferiblemente al menos 40 ml, más preferiblemente al menos 150 ml, todavía más preferiblemente al menos 470 ml y todavía más preferiblemente al menos 700 ml.
17. El método según uno cualquiera de los puntos 1, 9 y 10, en el que la estructura que tiene múltiples canales interconectados es un monolito o una estructura prefabricada tal como una geometría impresa en 3D.
18. El método del punto 17, en el que la estructura que tiene múltiples canales interconectados es un monolito, y en el que para el monolito, la fracción del volumen de vacíos con respecto al volumen total está en el intervalo de 0,5 a 0,75.
19. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 18, en el que el método es para la inactivación de virus, y en el que uno primero de dichos al menos dos líquidos es un líquido que contiene potencialmente un virus, y en el que un segundo líquido de dichos al menos dos líquidos comprende un agente de inactivación de virus.
20. El método según el punto 19, en el que dicho primer líquido comprende un fármaco biofarmacéutico.
21. El método según el punto 19 ó 20, en el que el método es para la inactivación de virus de virus con envoltura.
22. El método según uno cualquiera de los puntos 19 a 21, en el que dicho virus es un retrovirus y/o un virus de la familia *Flaviviridae*.
23. El método del punto 22, en el que dicho virus es un retrovirus, preferiblemente X-MuLV.
24. El método del punto 22, en el que dicho virus es un virus de la familia *Flaviviridae*, preferiblemente BVDV.
25. El método según uno cualquiera de los puntos 19 a 24, en el que el agente de inactivación de virus es una mezcla de disolvente/detergente adecuada para el tratamiento de inactivación de virus con disolvente/detergente, o una disolución ácida adecuada para el tratamiento de inactivación de virus a pH bajo.
26. El método según uno cualquiera de los puntos 19 a 25, en el que el agente de inactivación de virus es una mezcla de disolvente/detergente para el tratamiento con disolvente-detergente.
27. El método según uno cualquiera de los puntos 19 a 26, en el que el método logra al menos un valor de reducción Log₁₀ de 1 (LRV), al menos un LRV de 2, al menos un LRV de 4 o al menos un LRV de 6 para al menos un virus.
28. El método según el punto 27, en el que dicho al menos un virus es un virus según uno cualquiera de los puntos 22-24.

29. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 28, en el que la velocidad lineal superficial de dicha mezcla a través de dicha estructura es igual a o menor de 600 cm/h, o igual a o menor de 300 cm/h, o igual a o menor de 200 cm/h, o igual a o menor de 100 cm/h, o igual a o menor de 50 cm/h, o igual a o menor de 20 cm/h.
30. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 29, en el que el número de Bodenstein de dicha mezcla cuando pasa a través de dicha estructura que tiene múltiples canales interconectados es igual a o mayor de 50, preferiblemente igual a o mayor de 300, más preferiblemente igual a o mayor de 400, todavía más preferiblemente igual a o mayor de 500, todavía más preferiblemente igual a o mayor de 600, lo más preferiblemente igual a o mayor de 800.
31. Un método para preparar un fármaco biofarmacéutico, comprendiendo el método realizar el método de uno cualquiera de los puntos 20 a 31, y recuperar dicho fármaco biofarmacéutico.
32. Un dispositivo para la preparación de un fármaco biofarmacéutico, comprendiendo el dispositivo un lecho de relleno de perlas no porosas.
33. El dispositivo según el punto 32, en el que las perlas no porosas son perlas no porosas inertes.
34. El dispositivo según el punto 32 o el punto 33, en el que las perlas no porosas son perlas de vidrio, o perlas de cerámica, o perlas de plástico tal como perlas de PMMA, o perlas de acero.
35. El dispositivo según uno cualquiera de los puntos 32 a 34, en el que el diámetro medio de partícula de las perlas no porosas está en el intervalo de 0,05-1 mm, preferiblemente en el intervalo de 0,05-0,6 mm, más preferiblemente en el intervalo de 0,05-0,5 mm, lo más preferiblemente en el intervalo de 0,05-0,3 mm.
36. El dispositivo según uno cualquiera de los puntos 32 a 35, en el que las perlas no porosas no se desvían del diámetro medio de partícula en más del 50%, preferiblemente no más del 35%, lo más preferiblemente no más del 20%.
37. El dispositivo según uno cualquiera de los puntos 32 a 36, en el que el lecho de relleno de perlas no porosas tiene una longitud de al menos 5 cm, o al menos 10 cm, o al menos 20 cm, o al menos 30 cm, o al menos 50 cm, o al menos 70 cm, o al menos 100 cm.
38. El dispositivo según uno cualquiera de los puntos 32 a 37, en el que el lecho de relleno de perlas no porosas tiene una longitud de al menos 20 cm.
39. El dispositivo según uno cualquiera de los puntos 32 a 38, en el que el lecho de relleno de perlas no porosas puede obtenerse mediante un método que comprende someter dichas perlas no porosas a un tratamiento de vibración.
40. El dispositivo según uno cualquiera de los puntos 32 a 39, en el que para el lecho de relleno de perlas no porosas, la fracción del volumen de vacíos con respecto al volumen total está en el intervalo de 0,2 a 0,45.

41. El dispositivo según uno cualquiera de los puntos 32 a 39, en el que para el lecho de relleno de perlas no porosas, la fracción del volumen de vacíos con respecto al volumen total está en el intervalo de 0,37 a 0,42.
42. El dispositivo según uno cualquiera de los puntos 32 a 41, en el que el lecho de relleno de perlas no porosas está contenido en una columna y/o un reactor.
43. El dispositivo según el punto 42, en el que la columna tiene un diámetro de más de 5 mm, preferiblemente un diámetro de al menos 10 mm.
44. El dispositivo según uno cualquiera de los puntos 32 a 43, en el que el volumen de vacío del lecho de relleno de perlas no porosas es de al menos 10 ml, preferiblemente al menos 40 ml, más preferiblemente al menos 150 ml, todavía más preferiblemente al menos 470 ml y todavía más preferiblemente al menos 700 ml.
45. El dispositivo según uno cualquiera de los puntos 32 a 44, en el que el dispositivo comprende adicionalmente uno o múltiples mezcladores, que están conectados al lecho de relleno de perlas no porosas.
46. El dispositivo según el punto 45, en el que el mezclador es un mezclador estático tal como un mezclador de unión en T, o en el que el mezclador es un mezclador dinámico tal como un agitador dinámico.
47. El dispositivo según uno cualquiera de los puntos 32 a 46, en el que el dispositivo comprende adicionalmente un filtro, y en el que el filtro está situado preferiblemente entre el lecho de relleno de perlas no porosas y un mezclador estático según el punto 45 ó 46.
48. El dispositivo según el punto 47, en el que el filtro tiene un tamaño de poro de 0,2 μm .
49. El dispositivo según uno cualquiera de los puntos 32 a 48, en el que el dispositivo es un reactor de flujo continuo.
50. Un método para la modificación de un procedimiento de inactivación de virus de flujo continuo, en el que la modificación comprende usar una estructura que tiene múltiples canales interconectados para la inactivación de virus de flujo continuo, y hacer pasar una mezcla de al menos dos líquidos a través de dicha estructura, incubando de ese modo dicha mezcla para la inactivación de virus.
51. El método según el punto 50, en el que dicho procedimiento de inactivación de virus de flujo continuo es un procedimiento para la preparación de un fármaco biofarmacéutico.
52. El método según uno cualquiera de los puntos 50 a 51, en el que dicho procedimiento de inactivación de virus usa un agente de inactivación de virus para la inactivación de virus, y en el que uno primero de dichos al menos dos líquidos es un líquido que contiene potencialmente un virus, y en el que un segundo líquido de dichos al menos dos líquidos comprende un agente de inactivación de virus.
53. El método según uno cualquiera de los puntos 50 a 52, en el que dicho procedimiento de inactivación de virus es para la inactivación de virus de virus con envoltura.

54. El método según el punto 52 ó 53, en el que el agente de inactivación de virus usado en dicho procedimiento de inactivación de virus es una mezcla de disolvente/detergente adecuada para el tratamiento de inactivación de virus con disolvente/detergente, o una disolución ácida adecuada para el tratamiento de inactivación de virus a pH bajo.
55. El método según el punto 54, en el que el agente de inactivación de virus usado en dicho procedimiento de inactivación de virus es una mezcla de disolvente/detergente para el tratamiento con disolvente-detergente.
56. El método según uno cualquiera de los puntos 50 a 55, en el que la modificación comprende modificar el procedimiento de inactivación de virus para lograr al menos un valor de reducción Log10 de 1 (LRV), al menos un LRV de 2, al menos un LRV de 4 o al menos un LRV de 6 para al menos un virus.
57. El método según uno cualquiera de los puntos 50 a 56, en el que la modificación comprende modificar el procedimiento de inactivación de virus de manera que el número de Bodenstein de la mezcla que pasa a través de dicha estructura que tiene múltiples canales interconectados es igual a o mayor de 50, preferiblemente igual a o mayor de 300, más preferiblemente igual a o mayor de 400, todavía más preferiblemente igual a o mayor de 500, todavía más preferiblemente igual a o mayor de 600, lo más preferiblemente igual a o mayor de 800.
58. El método según uno cualquiera de los puntos 50 a 57, en el que la modificación comprende modificar el procedimiento de inactivación de virus de manera que la velocidad lineal superficial de la mezcla a través de dicha estructura es igual a o menor de 600 cm/h, o igual a o menor de 300 cm/h, o igual a o menor de 200 cm/h, o igual a o menor de 100 cm/h, o igual a o menor de 50 cm/h, o igual a o menor de 20 cm/h.
59. El método según uno cualquiera de los puntos 50 a 58, en el que la modificación comprende usar una estructura que tiene múltiples canales interconectados tal como se define en uno cualquiera de los puntos 4-18.
60. El método según uno cualquiera de los puntos 56 a 59, en el que la modificación comprende ajustar el flujo a lo largo del tiempo de dicha mezcla en dicha estructura para lograr dicho valor de reducción Log10 (LRV), y en el que el flujo a lo largo del tiempo se ajusta mediante el ajuste de la velocidad lineal superficial de la mezcla y/o el volumen de vacío de dicha estructura.

Se entenderá que aunque las realizaciones preferidas anteriores citan “incubar una mezcla de al menos dos líquidos” y “mezclar dichos al menos dos líquidos para obtener una mezcla”, la invención no se limita al uso de al menos dos líquidos. Por ejemplo, un método de la invención también puede ser un método para incubar una mezcla de al menos un líquido y al menos un sólido, comprendiendo el método i) mezclar dicho al menos un líquido y dicho al menos un sólido para obtener una mezcla; y ii) hacer pasar dicha mezcla a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados, incubando de ese modo dicha mezcla. Por ejemplo, en un método para la inactivación de virus según la invención, puede añadirse un agente de inactivación de virus en forma de al menos un sólido. Preferiblemente, el sólido puede estar en forma de un polvo. También se

entenderá que todas las realizaciones preferidas indicadas anteriormente también se aplican a este método que usa al menos un líquido y al menos un sólido.

Además, también se entenderá que aunque las realizaciones preferidas anteriores citan “incubar una mezcla de al menos dos líquidos” y “mezclar dichos al menos dos líquidos para obtener una mezcla”, la invención no se limita a estas etapas del método, sino que también puede llevarse a cabo como un método en el que se ha omitido la etapa de mezclado. Por ejemplo, la invención también se refiere a un método para incubar un líquido o para incubar una mezcla de al menos dos líquidos, comprendiendo el método hacer pasar dicho líquido o dicha mezcla a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados, incubando de ese modo dicho líquido o dicha mezcla. También se entenderá que todas las realizaciones preferidas indicadas anteriormente también se aplican a este método. La invención también se refiere a un método para incubar una mezcla de al menos un líquido y al menos un sólido, comprendiendo el método hacer pasar dicha mezcla a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados, incubando de ese modo dicha mezcla. De nuevo se entenderá que todas las realizaciones preferidas indicadas anteriormente también se aplican a este método.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: A) Ejemplo de un perfil de UV de un experimento de ruptura. Los volúmenes de elución (EV) en las señales del 5% y el 50% se indican mediante líneas verticales discontinuas. B) Diferentes perfiles de ruptura con números de EV/EV y números de Bodenstein correspondientes. El comienzo del perfil (que es crucial para la inactivación de virus) se refleja mejor en el número de EV/EV, que en número de Bodenstein.

Figura 2: Comparación entre experimentos de ruptura usando tampón acetona y tampón que contiene disolvente/detergente. Se enumeran las columnas y las velocidades lineales superficiales a las que se realizaron pares de experimentos con diferentes sistemas tampón. Se calcularon los parámetros de las curvas de ruptura (es decir EV_{5%}/EV_{50%} y números de Bodenstein) para cada sistema tampón. SD = combinación de tampón de fluido de proceso y tampón de fluido de proceso con adición de productos químicos disolventes/detergentes.

Figura 3: Comparación entre experimentos de ruptura usando tampón acetona y tampón que contiene disolvente/detergente. Cada punto de datos representa un par de experimentos con la misma configuración y diferentes sistemas tampón: Agua y acetona al 2% (Acetona), tampón de fluido de proceso con adición de productos químicos disolventes/detergentes (SD). Los parámetros calculados de las curvas de ruptura EV_{5%}/EV_{50%} y número de Bodenstein están muy bien correlacionados entre sistemas tampón.

Figura 4: Influencia de los parámetros de la columna y la velocidad lineal superficial sobre número de Bodenstein y EV_{1%}/EV_{50%}.

Figura 5: Influencia de la longitud de la columna sobre número de Bodenstein y $EV_{1\%}/EV_{50\%}$ como medida de bondad para la RTD. Las columnas se rellenaron con perlas del mismo lote. La nomenclatura de la columna usada a lo largo de las presentes figuras sigue el siguiente principio: por ejemplo, para una columna denominada “JS_10_ceramic_HR_26/19.5_0.125_0.25mm”, “10” es un número entero único dado a la columna, “Cerámica” indica el material de perlas no porosas, “26” es el diámetro de la columna [mm], “19,5” es la altura del lecho de relleno [cm], y “0.125_0.25mm” es el intervalo de tamaño de partícula indicado por los datos del fabricante de perlas.

Figura 6: Influencia de las velocidades lineales superficiales sobre $EV_{1\%}/EV_{50\%}$.

Figura 7: Modelo de predicción de mínimos cuadrados parciales (PLS) para los parámetros de bondad de RTD. La predicción se basa en la longitud de la columna, el volumen de la columna, la velocidad lineal superficial, el diámetro medio de las perlas y el intervalo de diámetro de las perlas.

Figura 8: Modelo de predicción de PLS para los parámetros de bondad de RTD. La predicción se basa en la longitud de la columna, el volumen de la columna, el diámetro medio de las perlas y el intervalo de diámetro de las perlas.

Figura 9: Influencia de la calidad del relleno sobre la RTD. La columna JS_07 se rellenó a mano con muchas burbujas de aire (es decir, la calidad del relleno fue mala). A bajas velocidades lineales superficiales, la columna mal rellena funcionó de manera similar a columnas bien rellenas con perlas más grandes. Sin embargo, a mayores velocidades lineales superficiales obtuvo malos resultados.

Figura 10: Reducción del límite de detección (LOD). Los experimentos de ruptura se realizaron usando acetona al 10%. La correlación entre $EV_{0,03\%}/EV_{50\%}$ ($\theta_{0,03\%}$) y $EV_{1\%}/EV_{50\%}$ ($\theta_{1\%}$) fue buena, especialmente para columnas bien rellenas.

Figura 11: Comparación de columnas rellenas con perlas no porosas según la presente invención e inversores de flujo helicoidales (CFI) conocidos en lo que se refiere a los números de Bodenstein. Se usaron perlas de vidrio no porosas en el lecho de relleno.

Figura 12: Comparación de columnas rellenas con perlas no porosas según la presente invención e inversores de flujo helicoidales (CFI) conocidos en lo que se refiere a los números de Bodenstein. Se usaron perlas de cerámica no porosas en el lecho de relleno.

Figura 13: Comparación de columnas rellenas con perlas no porosas según la presente invención e inversores de flujo helicoidales (CFI) conocidos en lo que se refiere a los números de Bodenstein. Se usaron perlas de vidrio no porosas, perlas de plástico de PMMA o perlas de cerámica en el lecho de relleno.

Figura 14: Realización a modo de ejemplo del dispositivo para la preparación de un fármaco biofarmacéutico que puede usarse para la inactivación de virus.

Figura 15: Las respuestas de inyección de pulso son derivados suavizados de curvas de ruptura experimentales. La línea gris gruesa representa el perfil de elución en el peor caso cuando se mantiene fijo el punto de LOD en ambas dimensiones. La curva negra gruesa representa los datos experimentales. La caída de señal al comienzo es una consecuencia de lavar los tubos en derivación antes de redirigir la muestra a través de la columna.

Figura 16: A, B: Tiempo de residencia requerido del comienzo de la curva de ruptura detectable (tiempo de LOD) dependiendo del límite de detección (LOD) y la razón de reducción viral requerida suponiendo que se logra el mismo LRV en el modo de incubación discontinua en 60 min y una cinética de reducción de virus logarítmica.

Figura 17: Mezcla de líquidos antes de entrar en el reactor de inactivación de virus continua (CVI). A: Mezcla de dos líquidos. B: Mezcla de tres líquidos. C: Mezcla de cualquier número de líquidos.

Figura 18: Orden de mezcla de líquidos antes de entrar en el reactor de inactivación de virus (CVI). A: Mezcla de dos líquidos. B: Mezcla de tres líquidos donde dos líquidos se mezclan antes de que el tercer líquido se mezcle con la mezcla resultante. C: Mezcla de cualquier número de líquidos antes de que sea posible la adición de líquidos adicionales.

Figura 19: Etapas de procedimiento a modo de ejemplo (y unidades correspondientes del reactor) aguas arriba de la inactivación de virus (CVI). A: Se incorpora un tanque de compensación antes de la inactivación de virus. (izquierda) Cromatografía discontinua aguas arriba de la CVI. (parte central) Cromatografía de carga a contracorriente aguas arriba de la CVI. (derecha) Cromatografía de lecho móvil simulada aguas arriba de la CVI. B: Procesamiento directo sin interrupciones sin tanque de compensación. (izquierda) Cromatografía discontinua. (parte central) Cromatografía de carga a contracorriente. (derecha) Cromatografía de lecho móvil simulada.

Figura 20: Etapas de procedimiento a modo de ejemplo (y unidades correspondientes del reactor) aguas abajo de la inactivación de virus. A: Extracción con disolvente-detergente en modo a contracorriente. B: Extracción

con disolvente-detergente en modo de flujo paralelo. C: Cromatografía discontinua. D: Cromatografía de carga a contracorriente. E: Cromatografía de lecho móvil simulada.

Figura 21: A: Una columna grande de 1,75 l tiene un número de Bodenstein mucho más grande (distribución de tiempo de residencia mucho más estrecha) que cualquier columna de escala de laboratorio (más pequeña), mientras que algunas de las columnas de escala de laboratorio ya superan por completo los reactores de inversores de flujo helicoidales en lo que se refiere al número de Bodenstein. B: igual que el panel A, excepto que las escalas están en forma logarítmica. C: La columna de 1,75 l grande funciona muy bien. En comparación, una columna más pequeña ($d = 26 \text{ mm}$, $l = 19,5 \text{ cm}$) rellena con el mismo lote de perlas que logró una puntuación de $EV_{1\%}/EV_{50\%}$ en el intervalo de 0,88-0,92 y números de Bodenstein en el intervalo de 800-1800.

Figura 22: Imagen de un ejemplo ilustrativo de un dispositivo de vibración usado para relleno de columna. 1. Motor de vibración, 2. Armazón de acero, 3. Columna, 4. Sensor de movimiento, 5. Registrador de datos, 6. Control de potencia.

Figura 23: Explicación ilustrativa de la velocidad lineal superficial [cm/h]: La velocidad lineal superficial es la velocidad lineal a la que se desplaza el fluido suponiendo que la estructura (por ejemplo, el lecho de relleno de perlas no porosas) está vacía, por ejemplo no llena con perlas. En la figura se muestra una estructura a modo de ejemplo (ilustrada en forma de un cilindro que está lleno con canales interconectados (B) o vacío (A)).

Figura 24: Diagrama de la configuración de la CVI. La configuración consiste en dos bombas, un mezclador y la CVI.

Figura 25: Perfil de concentración en la salida para el procedimiento de CVI. El gráfico muestra la concentración de salida (C) normalizada para la concentración en la entrada (C_0). El procedimiento se divide en dos fases: una fase de inicio (o latencia) y una fase de estado estacionario. La fase de inicio se representa por una parte de la curva inicial del 0% de concentración y una transición posterior desde el 0 hasta el 100% de la concentración. La fase de inicio representa el desplazamiento y el lavado de la fase líquida previamente dentro del CVIR hasta que la concentración en la salida coincide con la de la entrada. La fase de estado estacionario se representa por la parte de la curva del 100% de concentración. En este ejemplo, el estado estacionario comienza antes de $2 V_R$.

Figura 26: Resultados del título de virus para el procedimiento de CVI en un tiempo de incubación de 30 y 60 min (en los gráficos izquierdo y derecho, respectivamente). El marcador a $0 V_R$ representa el título de X-MuLV del elemento de prueba añadido antes de mezclar con los componentes de S/D. Los marcadores en 1, 2, 3, 4 y 5 V_R representan los títulos de X-MuLV en la salida del CVIR después del funcionamiento para 1, 2,

3, 4 y 5 volúmenes de reactor, respectivamente. Los marcadores rellenos muestran el título de virus y los marcadores vacíos representan muestras con títulos por debajo del LOD.

Figura 27: El LRV para diversas muestras recogidas durante el procedimiento de inactivación de virus continuo con tiempo de incubación de 30 y 60 min (parte superior e inferior, respectivamente). Las muestras mostradas se tomaron después de 1, 2, 3, 4 y 5 V_R de funcionamiento y también incluyen un control de mantenimiento (HC). La muestra de HC se extrajo de la misma jeringa que contenía la prueba añadida tiempo después de haber finalizado la CVI (después de 5 V_R). Las barras rellenas muestran los datos de LRV y las barras rellenas con un patrón en diagonal representan el LRV mínimo debido a muestras que se encuentran por debajo del LOD.

Figura 28: El LRV para diversas muestras recogidas durante el procedimiento de inactivación de virus discontinuo tradicional. Las muestras mostradas se tomaron después de 60 min de incubación y también incluyen un control de mantenimiento (HC). La muestra de HC se obtuvo mediante la incubación del elemento de prueba añadido sin productos químicos S/D en las mismas condiciones en que se realiza la inactivación que contiene S/D. Las barras rellenas muestran los datos de LRV y las barras rellenas con un patrón en diagonal representan el LRV mínimo debido a muestras que se encuentran por debajo del LOD.

Figura 29: Resultados del título de virus para el procedimiento de CVI en un tiempo de incubación de 30 y 60 min (en los gráficos izquierdo y derecho, respectivamente). El marcador a 0 VR representa el título de BVDV del elemento de prueba añadido antes de mezclar con los componentes de S/D. Los marcadores en 1, 2, 3, 4 y 5 VR representan los títulos de BVDV en la salida del CVIR después del funcionamiento para 1, 2, 3, 4 y 5 volúmenes de reactor, respectivamente. Los marcadores rellenos muestran el título de virus y los marcadores vacíos representan muestras con títulos que se encuentran por debajo del LOD.

Figura 30: El LRV para diversas muestras recogidas durante el procedimiento de inactivación de virus continuo con tiempo de incubación de 30 y 60 min (parte superior e inferior, respectivamente). Las muestras mostradas se tomaron después de 1, 2, 3, 4 y 5 V_R de funcionamiento y también incluyen un control de mantenimiento (HC). La muestra de HC se extrajo de la misma jeringa que contenía la prueba añadida tiempo después de haber finalizado la CVI (después de 5 V_R). Las barras rellenas muestran los datos de LRV y las barras rellenas con un patrón en diagonal representan el LRV mínimo debido a muestras que se encuentran por debajo del LOD.

Figura 31: El LRV para diversas muestras recogidas durante el procedimiento de inactivación de virus discontinuo tradicional. Las muestras mostradas se tomaron después de 60 min de incubación y también incluyen un control de mantenimiento (HC). La muestra de HC se obtuvo mediante la incubación del elemento de prueba añadido sin productos químicos S/D en las mismas condiciones en que se realiza la inactivación

que contiene S/D. Las barras rellenas muestran los datos de LRV y las barras rellenas con un patrón en diagonal representan el LRV mínimo debido a muestras que se encuentran por debajo del LOD.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

A menos que se defina de otro modo a continuación, los términos usados en la presente invención se entenderán según su significado común conocido por el experto en la técnica.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en el presente documento se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad para todos los fines.

La expresión “tiempo de residencia”, tal como se usa en el presente documento, se refiere en general a la cantidad de tiempo que transcurre desde el momento en que una parte del líquido entra en una parte de los equipos de procesamiento hasta que la misma parte del líquido sale de la parte de los equipos de procesamiento. Si la velocidad lineal promedio de una parte del líquido es alta, el tiempo de residencia es corto. Si la velocidad lineal promedio de una parte del líquido es baja, el tiempo de residencia es largo. En una realización preferida de la invención, la expresión “tiempo de residencia” se refiere a la cantidad de tiempo que transcurre desde el momento en que una parte del líquido entra en la estructura que tiene múltiples canales interconectados hasta que la misma parte del líquido sale de la estructura que tiene múltiples canales interconectados. De manera alternativa, y más preferible, la expresión se refiere al número de volúmenes de columna que pasan desde el momento en que una parte del líquido entra en la estructura que tiene múltiples canales interconectados hasta que la misma parte del líquido sale de la estructura que tiene múltiples canales interconectados. El tiempo de residencia y el volumen de elución están relacionados mediante la siguiente fórmula:

Volumen de elución (medido en volúmenes de columna) = tiempo de residencia · sección transversal de la columna · velocidad lineal superficial

Cuando diferentes partes del líquido tienen diferentes tiempos de residencia, aunque todas las partes del líquido entren en una parte de los equipos de procesamiento (por ejemplo, la estructura que tiene múltiples canales interconectados según la invención) al mismo tiempo, las partes del líquido se distribuyen con respecto a su tiempo de residencia. Dicho de otro modo, las diferentes partes del líquido muestran una distribución de tiempos de residencia, que también se denomina una “distribución de tiempo de residencia” o “RTD”. Si hay una gran diferencia entre las velocidades de flujo entre las diferentes partes del líquido, la distribución de tiempo de residencia amplia; si hay una pequeña diferencia en las velocidades de flujo entre las diferentes partes del líquido, la distribución de tiempo de residencia es estrecha. Una de las ventajas de la estructura que tiene

múltiples canales interconectados según la invención es que permite obtener una distribución de tiempo de residencia estrecha.

Ha de entenderse que la expresión “mezcla de al menos un líquido y al menos un sólido” define que en el momento en que se mezclan dicho al menos un líquido y al menos un sólido, el sólido estaba presente en estado sólido. Esto no excluye la posibilidad de que en dicha mezcla de al menos un líquido y al menos un sólido, el sólido pueda disolverse, por ejemplo mientras se llevan a cabo etapas de método adicionales según la invención.

Según todas las demás realizaciones de la invención, la mezcla de dos líquidos o la mezcla de al menos un líquido y al menos un sólido puede ser una disolución acuosa.

La expresión “canales interconectados”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a canales en una estructura son accesibles a fluidos procedentes del exterior de dicha estructura. Al menos algunos de los canales están interconectados entre sí. De este modo, cuando la estructura se expone a un líquido, el líquido puede pasar a través de la estructura a través de esos canales que están interconectados entre sí. Se entiende que la estructura que tiene múltiples canales interconectados a la que se hace referencia en relación con la invención es de manera que sea adecuada para hacer pasar la mezcla de los al menos dos líquidos según la invención a través de la estructura.

La expresión “continuo” o “de manera continua” o “flujo continuo”, tal como se usa en el presente documento en relación con el método o el procedimiento de la invención o con etapas del mismo, tiene el significado que se conoce comúnmente en la técnica. Describe un método o procedimiento o etapas del mismo que se produce(n) sin interrupción. Si la expresión “continuo” o “de manera continua” o “flujo continuo” se usa en el presente documento según etapas particulares del método o procedimiento (por ejemplo con la etapa de mezclar y hacer pasar según la invención), significa que esta etapa se produce sin interrupción. Si la expresión “continuo” o “de manera continua” o “flujo continuo” se usa en el presente documento según un método o un procedimiento de la invención, significa que dicho método o procedimiento se produce sin interrupción. Preferiblemente, cuando el método o procedimiento se lleva a cabo de manera continua, todas las etapas del método o procedimiento se llevan a cabo de manera continua. Alternativamente, también es posible que sólo la salida del método o procedimiento sea continua, mientras que partes de dicho método o procedimiento (por ejemplo etapas particulares del método o procedimiento) se llevan a cabo de manera discontinua o semicontinua. Por ejemplo, una serie de procedimientos discontinuos pueden producir una salida continua a lo largo del tiempo, aunque los procedimientos individuales se realicen de manera discontinua.

La expresión “perlas no porosas”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier perla no porosa adecuada que puede usarse para un lecho de relleno de perlas no porosas según la invención. Las

“perlas no porosas” pueden ser de forma esférica o irregular. En una realización preferida según las demás realizaciones de la invención, las perlas no porosas son preferiblemente esféricas. Las “perlas no porosas” pueden estar compuestas, por ejemplo, por cualquier material particulado sólido que sea compatible con el procesamiento biofarmacéutico, por ejemplo plástico, vidrio o metal.

Se conocen en la técnica perlas no porosas y están disponibles comercialmente.

Se conocen en la técnica perlas de vidrio y pueden estar compuestas, por ejemplo por vidrio de sílice. Por ejemplo, pueden adquirirse perlas de vidrio de Cospheric LLC.

También se conocen perlas de plástico y pueden estar compuestas, por ejemplo, por poli(metacrilato de metilo) (PMMA), polietileno (PE), polipropileno (PP) o poliestireno (PS). Por ejemplo, pueden adquirirse perlas de plástico de Cospheric LLC, Altuglas Arkema y Kisker Biotech.

También se conocen en la técnica perlas de acero y pueden estar compuestas, por ejemplo, por acero inoxidable. Por ejemplo, pueden adquirirse perlas de acero de Cospheric LLC.

La expresión “perlas de cerámica”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier perla de cerámica que sea adecuada para formar un “lecho de relleno de perlas no porosas” según la invención. Por ejemplo, pueden adquirirse perlas de cerámica de Kuhmichel Abrasiv GmbH.

El lecho de relleno de perlas no porosas según la invención no está limitado particularmente y puede estar contenido, por ejemplo, en recipientes de diversas formas, tales como columnas o reactores. El tamaño del recipiente no está limitado particularmente, y puede seleccionarse basándose en el rendimiento y el tiempo de incubación deseados.

El término “inerte” en relación con las perlas no porosas de la invención tiene el significado del término que se conoce en la técnica. En una realización preferida, las perlas no porosas inertes no están funcionalizadas en modo alguno. Los materiales inertes para las perlas no porosas de la invención pueden elegirse por un experto en la técnica. Por ejemplo, en un método o procedimiento de la invención, será posible seleccionar materiales inertes conocidos apropiados de manera que no reaccionen o que no reaccionen sustancialmente (por ejemplo, no de manera medible) con el líquido o la mezcla de líquidos que se hace pasar a través del lecho de perlas. Por ejemplo, las perlas no porosas inertes de la invención son preferiblemente perlas que no reaccionan o que no reaccionan sustancialmente de manera química con la mezcla líquida de la presente invención. Las perlas no porosas inertes de la invención son preferiblemente perlas que no añaden componentes a la mezcla líquida. Las perlas no porosas inertes de la invención preferiblemente no absorben o adsorben componentes de la mezcla líquida.

La expresión “desviarse del diámetro medio de partícula” en un porcentaje dado, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una desviación que depende del diámetro medio de partícula. Por ejemplo, si las perlas con un diámetro medio de partícula de 0,2 mm no se desvían del diámetro medio de partícula en más del 50%, el 95% de las perlas tienen un diámetro de partícula de no más de 0,3 mm y no menos de 0,1 mm. De manera similar, si las perlas con un diámetro medio de partícula de 0,2 mm no se desvían del diámetro medio de partícula en más del 20%, el 95% de las perlas tienen un diámetro de partícula de no más de 0,24 mm y no menos de 0,16 mm. Para las partículas que van a usarse según la presente invención que no son esféricas, el diámetro se refiere al eje más largo de las partículas.

La expresión “tratamiento de vibración”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tratamiento que implica vibración y que sea adecuado para aumentar la densidad de relleno del lecho de relleno de perlas no porosas. Por ejemplo, puede usarse un dispositivo vibratorio para someter el lecho de relleno de perlas no porosas a tratamiento de vibración.

Un dispositivo vibratorio preferible contiene una gradilla en la que se inmoviliza la columna. En un ejemplo de un tratamiento de vibración que usa un dispositivo vibratorio, la columna vacía se inmoviliza, y las perlas se añaden durante la vibración. Entonces se hace vibrar la gradilla usando un motor de vibración. Dicho motor puede estar alimentado, por ejemplo, eléctrica o neumáticamente. Los lechos de relleno de perlas no porosas pueden rellenarse usando una frecuencia de vibración de menos de 40 kHz, preferiblemente de 1-10 kHz, una aceleración de menos de 10 g, preferiblemente 0-5 g, y una amplitud de vibración de menos de 5 mm, preferiblemente de hasta 2 mm. Un ejemplo ilustrativo de un dispositivo vibratorio usado para relleno de columna se muestra en la figura 22.

El término “reactor”, tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier recipiente u otra estructura que sea adecuada para contener fluidos. El reactor puede usarse con el fin de permitir que los fluidos reaccionen químicamente. Sin embargo, en la presente invención, el término “reactor” también se refiere a reactores en los que no se produce ninguna reacción química. Se entiende que el reactor puede ajustarse basándose en el uso deseado. Por ejemplo, se entiende que un reactor que se usa para la inactivación de virus será adecuado para la inactivación de virus. Asimismo, si el reactor se usa para la preparación de un fármaco biofarmacéutico será adecuado para la preparación de ese fármaco.

La expresión “geometría impresa en 3D”, tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier estructura porosa prefabricada que se imprime usando una impresora 3D.

La expresión “virus con envoltura”, tal como se usa en el presente documento, tiene el significado conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, un virus con envoltura puede ser *Herpesviridae* tal como el virus del

herpes simple, el virus de la varicela-zóster, el citomegalovirus o el virus de Epstein–Barr; *Hepadnaviridae* tal como el virus de la hepatitis B; *Togaviridae* tal como el virus de la rubeola o alfavirus; *Arenaviridae* tal como el virus de la coriomeningitis linfocítica; *Flaviviridae* tal como el virus del dengue o el virus de la diarrea viral bovina (BVDV), el virus de la hepatitis C o el virus de la fiebre amarilla; *Orthomyxoviridae* tal como el virus influenza A, el virus influenza B, el virus influenza C, isavirus o thogotovirus; *Paramyxoviridae* tal como el virus del sarampión, el virus de las paperas, el virus respiratorio sincitial, el virus de la peste bovina o el virus del moquillo canino; *Bunyaviridae* tal como el virus de la encefalitis de California o el hantavirus; *Rhabdoviridae* tal como el virus de la rabia; *Filoviridae* tal como el virus del Ébola o el virus de Marburgo; *Coronaviridae* tal como el coronavirus; *Bornaviridae* tal como el virus de la enfermedad de Borna; o *Arteriviridae* tal como el arterivirus o el virus de arteritis equina; *Retroviridae* tal como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de la leucemia murina xenotrópica (X-MuLV), el virus linfotrópico de células T humanas de tipo 1 (HTLV-1); *Poxviridae* tal como *Orthopoxvirus variolae* (virus de la viruela).

La expresión “mezcla de disolvente/detergente”, tal como se usa en el presente documento tiene el significado conocido por el experto en la técnica. La expresión “mezcla de disolvente/detergente” también se refiere a mezclas que contienen sólo disolventes o sólo detergentes. En una realización preferida, la mezcla de disolvente/detergente usada según la invención contiene al menos un disolvente distinto de agua y al menos un detergente. El número de disolventes y/o detergentes diferentes contenidos en la mezcla no está limitado particularmente. Por ejemplo, la mezcla de disolvente/detergente puede estar compuesta por fosfato de tri-n-butilo, polisorbato 80 y Triton X-100.

La expresión “tratamiento de inactivación de virus con disolvente-detergente”, tal como se usa en el presente documento, tiene el significado conocido por el experto en la técnica. En una realización preferida, pueden usarse tratamientos con disolvente-detergente contra virus con envoltura, por ejemplo retirando la membrana lipídica del virus con envoltura. Sin embargo, el “tratamiento de inactivación de virus con disolvente-detergente” de la presente invención no se limita a esto. Por ejemplo, un “tratamiento de inactivación de virus con disolvente-detergente” de la presente invención también puede incluir tratamientos de virus sin envoltura, que actúan, por ejemplo, desnaturalizando proteínas sobre la superficie de un virus tal como un virus sin envoltura.

La expresión “valor de reducción Log10” o “LRV”, tal como se usa en el presente documento es una medida de la reducción de partículas víricas infecciosas en un fluido, definida como el logaritmo (en base 10) de la razón de la concentración de partículas víricas infecciosas antes de la inactivación del virus con respecto a la concentración de partículas víricas infecciosas después de la inactivación del virus. El valor de LRV es específico para un tipo dado de virus. Es evidente para un experto en la técnica que cualquier valor de reducción Log10 (LRV) por encima de cero es beneficioso para mejorar la seguridad de los métodos y procedimientos, tales como los métodos y procedimientos de producción de productos biofarmacéuticos. Según la invención, los LRV pueden medirse mediante cualquier método apropiado conocido en la técnica.

Preferiblemente, los LRV a los que se hace referencia en el presente documento son LRV medidos mediante ensayo en placa o medidos mediante el ensayo de TCID₅₀, más preferiblemente medidos mediante el ensayo de TCID₅₀. Estos ensayos los conoce el experto en la técnica. Preferiblemente, los LRV a los que se hace referencia según la invención son LRV de un virus con envoltura. Por ejemplo, un “ensayo de TCID₅₀” tal como se usa en el presente documento se refiere a un ensayo de dosis infecciosa de cultivo tisular. El ensayo de TCID₅₀ es una prueba de dilución de punto final, en la que el valor de TCID₅₀ representa la concentración viral necesaria para inducir la muerte celular o cambios patológicos en el 50% de los cultivos celulares inoculados.

Las expresiones “caudal” y “caudal volumétrico”, tal como se usan según la invención se usan de manera intercambiable y se refieren al volumen de la mezcla que pasa a través de la estructura que tiene múltiples canales interconectados según la invención por cantidad del tiempo. El caudal volumétrico (o caudal) se mide preferiblemente en ml/min. El caudal volumétrico (o caudal) es constante independientemente del diámetro de los tubos, independientemente del diámetro de la estructura que tiene múltiples canales interconectados (por ejemplo la columna), e independientemente del pistón de la bomba. Normalmente se establece cambiando la velocidad de la bomba al caudal deseado. Por ejemplo, si se usan una o más bombas aguas arriba de la estructura que tiene múltiples canales interconectados, el caudal volumétrico (o caudal) es el volumen total desplazado por dichas bombas por cantidad de tiempo. Por ejemplo, las bombas de pistón, por ejemplo suministran un volumen de fluido definido en cada carrera del pistón. Las bombas de jeringa se accionan por un motor lineal. Usando el diámetro de la jeringa y la distancia en que el motor empuja al pistón de la jeringa, puede calcularse el volumen desplazado por cantidad de tiempo. Alternativamente, el caudal también puede medirse mediante caudalímetros que se conocen en la técnica.

Generalmente, una “velocidad lineal” se define como un caudal dividido por el área de sección transversal de la estructura a través de la cual está pasando líquido:

$$\text{velocidad lineal} = (\text{caudal volumétrico})/(\text{área de sección transversal})$$

La expresión “velocidad lineal”, tal como se usa en relación con la estructuras de la invención se refiere al caudal volumétrico, dividido entre el área de sección transversal de la estructura que tiene múltiples canales interconectados. La sección transversal normalmente puede ser circular, es decir la sección transversal es un círculo.

En una estructura que tiene múltiples canales interconectados de la invención, tal como un lecho de relleno de perlas no porosas, pueden distinguirse dos velocidades lineales de fluido diferentes:

- a) Velocidad lineal superficial (indicada preferiblemente en [cm/h]): la velocidad lineal superficial es la velocidad lineal a la que se desplaza el fluido suponiendo que la estructura (por ejemplo el lecho de relleno de

perlas no porosas) está vacía, por ejemplo no llena con perlas. En la figura 23 se muestra una estructura a modo de ejemplo (ilustrada en forma de un cilindro que está lleno con canales interconectados (B) o vacío (A)).

b) Velocidad lineal intersticial (indicada preferiblemente en [cm/h]): la velocidad intersticial es la velocidad real del fluido a través de la estructura que tiene múltiples canales interconectados (por ejemplo a través del lecho de relleno de perlas no porosas). Puesto que el fluido sólo puede fluir a través de los canales interconectados (por ejemplo, alrededor de las perlas), la velocidad intersticial siempre es mayor que la velocidad superficial.

A menos que se indique de otro modo, todas las apariciones de la expresión “velocidad lineal”, tal como se usa en el presente documento, se refieren a la velocidad lineal superficial. La velocidad lineal superficial puede calcularse dividiendo el caudal (o caudal volumétrico) entre el área de sección transversal de la estructura que tiene múltiples canales interconectados, suponiendo que la estructura está vacía.

La expresión “límite de detección” o “LOD”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la porción detectable más baja de una sustancia, por ejemplo a la porción detectable más baja de perlas en suspensión. La expresión “tiempo límite de detección” o “tiempo de LOD”, tal como se usa en el presente documento se refiere al punto de tiempo en el que la señal que emana de una sustancia, por ejemplo de una sustancia indicadora, tal como perlas en suspensión, supera el límite de detección (LOD).

La expresión “número de Bodenstein”, tal como se usa en el presente documento, tiene el significado conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, se describe en Levenspiel, Chemical Reaction Engineering, 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999 (referencia 8), que se incorpora como referencia en su totalidad para todos los fines. El número de Bodenstein es adimensional y caracteriza la retromezcla dentro de un sistema. Por tanto, el número de Bodenstein puede indicar hasta qué punto se retromezclan volúmenes de líquido o compuestos. Por ejemplo, un número de Bodenstein pequeño indica un gran grado de retromezcla, mientras que un número de Bodenstein pequeño indica un pequeño grado de retromezcla. Tal como conocerá experto en la técnica, el número de Bodenstein puede usarse como medida de la distribución de tiempo de residencia y puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica. En la presente invención, el número de Bodenstein puede calcularse preferiblemente ajustando la función F a curvas de ruptura (tal como se ejemplifica en los ejemplos; véase por ejemplo la figura 1A), donde F(EV) representa la integral de un pico gaussiano (por ejemplo una señal de UV de una sustancia indicadora añadida a la mezcla que se hace pasar a través de la estructura que tiene múltiples canales interconectados según la invención) y Bo representa el número de Bodenstein, EV representa el volumen de elución en un punto de tiempo dado y EV_{50%} representa el volumen de elución en tiempo de residencia medio:

$$F(EV) = \frac{1}{2} \left(\operatorname{erf} \left(\frac{1}{2} \sqrt{Bo} \left(\frac{EV}{EV_{50\%}} - 1 \right) \right) + 1 \right)$$

La figura 1B representa algunos perfiles de ruptura diferentes con los correspondientes números de EV/EV y números de Bodenstein. La figura demuestra que el comienzo del perfil (que es crucial en particular para la inactivación de virus) se refleja mucho mejor en el número de EV/EV, que en el número de Bodenstein.

Según la presente invención, cada aparición de la expresión “que comprende” puede sustituirse opcionalmente por la expresión “que consiste en”.

A continuación se describirán realizaciones específicas de la invención, pero la invención no se limita a las mismas. Además, cualquiera de las realizaciones a continuación puede combinarse con cualquiera de las demás realizaciones a continuación según la presente invención.

La estructura que tiene múltiples canales interconectados que va a usarse según la invención puede ser un monolito o una estructura prefabricada tal como una geometría impresa en 3D, pero preferiblemente es un lecho de relleno de perlas no porosas. Por tanto, particularmente el lecho de relleno de perlas no porosas puede combinarse con cualquier otra realización de la presente invención.

El lecho de relleno de perlas no porosas que va a usarse según la presente invención puede estar contenido en recipientes de diversas formas, tales como columnas y/o reactores. Preferiblemente, el lecho de relleno de perlas no porosas llena completamente el recipiente, es decir no deja ningún hueco grande. Preferiblemente, el recipiente comprende al menos una entrada y al menos una salida que están situadas en extremos opuestos del recipiente. De este modo, puede entrar un fluido el recipiente a través de la entrada, pasar a través del lecho de relleno de perlas no porosas, y salir del recipiente a través de la salida. Preferiblemente, el recipiente es una columna.

El recipiente para el lecho de relleno de perlas no porosas que va a usarse según la presente invención puede tener cualquier forma, por ejemplo puede tener una base circular, una base angular, o una base rectangular. Preferiblemente, el recipiente tiene una base circular. En una realización particularmente preferida de la invención, el lecho de relleno de perlas no porosas que va a usarse según la presente invención está contenido en una columna con una base circular.

La longitud del lecho de relleno de perlas no porosas que va a usarse según la presente invención no está limitada particularmente, y puede ajustarse teniendo en cuenta el rendimiento deseado, la velocidad lineal superficial deseada y el tiempo de residencia medio deseado del líquido. En particular, la longitud del lecho de relleno de perlas no porosas puede seleccionarse basándose en la velocidad lineal superficial deseada y el tiempo de residencia medio deseado del líquido. Por ejemplo, si la velocidad lineal superficial deseada es de 20 cm/h y se supone que la porosidad del lecho de relleno de perlas no porosas es igual a 0,4, y el tiempo de residencia medio deseado es de al menos 1 h, entonces es necesario que la longitud del lecho de relleno de

perlas no porosas sea de al menos 50 cm. Si la velocidad lineal superficial deseada es de 20 cm/h, y el tiempo de residencia medio deseado es de al menos 3 h, entonces es necesario que la longitud del lecho de relleno de perlas no porosas sea de al menos 150 cm. En una realización preferida, la velocidad lineal superficial deseada es de aproximadamente 20 cm/h y el tiempo de residencia medio deseado es de al menos 1 hora, de modo que es necesario que el lecho de relleno de perlas no porosas tenga una longitud de al menos 50 cm. Los inventores han descubierto que cuanto más largo es el lecho de relleno de perlas no porosas que va a usarse según la presente invención, más estrecha es la distribución de tiempo de residencia de un líquido que se hace pasar a través del lecho de perlas no porosas. Por tanto, si el lecho de relleno de perlas no porosas que va a usarse según la presente invención es más largo (por ejemplo si tiene una longitud de al menos 5 cm, o al menos 10 cm, o al menos 20 cm, o al menos 30 cm, o al menos 50 cm, o al menos 70 cm, o al menos 100 cm) esto es ventajoso para una distribución de tiempo de residencia estrecha.

La anchura o el diámetro del lecho de relleno de perlas no porosas que va a usarse según la presente invención no está limitado particularmente, y puede seleccionarse basándose en el rendimiento deseado, la velocidad lineal superficial deseada y el tiempo de residencia medio deseado del líquido. Es evidente para el experto que la anchura o el diámetro del lecho de relleno de perlas no porosas se seleccionará teniendo en cuenta el tamaño de las perlas. Dicho de otro modo, la anchura o el diámetro del lecho de relleno de perlas no porosas se elegirá de manera que sea suficiente con el fin de albergar las perlas. En una realización preferida de la invención, el diámetro de la columna es de 5 mm, preferiblemente de al menos 10 mm.

El volumen del lecho de relleno de perlas no porosas que va a usarse según la presente invención no está limitado particularmente, y puede seleccionarse teniendo en cuenta el rendimiento deseado, la velocidad lineal superficial deseada y el tiempo de residencia medio deseado del líquido. Sin embargo, los inventores han descubierto sorprendentemente que los volúmenes grandes del lecho de relleno de perlas no porosas proporcionan distribuciones de tiempo de residencia más estrechas que los volúmenes pequeños cuando se hace pasar un líquido a través del lecho de perlas no porosas. Por tanto, se prefieren los volúmenes grandes del lecho de relleno de perlas no porosas, por ejemplo volúmenes de vacío de al menos 10 ml, preferiblemente al menos 40 ml, más preferiblemente al menos 150 ml, todavía más preferiblemente al menos 470 ml y todavía más preferiblemente al menos 700 ml.

Las perlas no porosas que forman el lecho de relleno de perlas no porosas para su uso según la presente invención pueden tener diversos diámetros medios de partícula. Se entenderá que el diámetro de las perlas no porosas puede seleccionarse fácilmente de manera que los canales interconectados formados por los espacios entre las perlas sean adecuados para que los componentes (por ejemplo, fármacos biofarmacéuticos) del líquido (por ejemplo, de la mezcla usada según la presente invención) pasen a través del lecho de relleno de perlas no porosas. Por otro lado, los inventores han descubierto sorprendentemente que cuanto menor es el diámetro medio de partícula de las perlas que forman el lecho de relleno de perlas no porosas según la presente

invención, más estrecha es la distribución de tiempo de residencia de un líquido que se hace pasar a través del lecho de relleno. Por tanto, las perlas que van a usarse según la presente invención están preferiblemente en el intervalo de 0,05 mm a 1 mm, más preferiblemente en el intervalo de 0,05 mm a 0,6 mm, todavía más preferiblemente en el intervalo de 0,05 mm a 0,5 mm y lo más preferiblemente en el intervalo de 0,05 mm a 0,3 mm. Además, los inventores han descubierto sorprendentemente que cuanto más homogéneo es el diámetro medio de partícula de las perlas que van a usarse según la presente invención, más estrecha es la distribución de tiempo de residencia de un líquido que se hace pasar a través del lecho de relleno de perlas no porosas. Por tanto, las perlas que van a usarse según la presente invención preferiblemente no se desvían del diámetro medio de partícula en más del 50%, más preferiblemente no más del 35%, lo más preferiblemente no más del 20%.

Preferiblemente, las perlas no porosas que forman el lecho de relleno de perlas no porosas para su uso según la presente invención son inertes.

Preferiblemente, las perlas no porosas que forman el lecho de relleno de perlas no porosas para su uso según la presente invención son esféricas.

Las perlas no porosas pueden rellenarse mediante varios medios para formar el lecho de relleno de perlas no porosas para su uso según la presente invención. Los inventores han descubierto que las diferencias en la calidad de rellenado afectan a las trayectorias de flujo de los líquidos que se hacen pasar a través del lecho de relleno de perlas no porosas, y por tanto a la distribución de tiempo de residencia.

Medios a modo de ejemplo para rellenar las perlas no porosas para su uso según la presente invención son rellenado en seco o rellenado en húmedo, con y sin tratamiento de vibración. El rellenado de líquido puede ser por gravedad o bajo flujo. Un medio preferido para rellenar las perlas no porosas para su uso según la presente invención es el tratamiento de vibración de rellenado. También se prefiere el rellenado en húmedo, más preferiblemente en combinación con tratamiento de vibración. La calidad del rellenado puede determinarse por ejemplo mediante la determinación de la distribución de tiempo de residencia de un líquido que se hace pasar a través del lecho de relleno de perlas no porosas. Una distribución de tiempo de residencia estrecha es indicativa de buena calidad de rellenado, una distribución de tiempo de residencia amplia es indicativa de mala calidad de rellenado.

El método para incubar una mezcla de al menos dos líquidos según la presente invención comprende mezclar dichas al menos dos mezclas para obtener una mezcla y hacer pasar dicha mezcla a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados, incubando de ese modo dicha mezcla. Preferiblemente, dichos mezclado y paso se llevan a cabo de manera continua. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que cuando pasa un líquido, tal como una mezcla de al menos dos líquidos según la invención, a través de la

estructura que tiene múltiples canales interconectados con el fin de incubar dicho líquido (por ejemplo dicha mezcla), la incubación tiene lugar con una distribución de tiempo de residencia particularmente estrecha. Una distribución de tiempo de residencia estrecha de este tipo es ventajosa para todos los tipos de procedimientos que funcionan de manera continua, en los que tienen que mezclarse líquidos e incubarse durante periodos de tiempo definidos, porque permite elegir los tiempos de incubación de manera más precisa.

En el método para incubar según la invención, la velocidad lineal superficial de la mezcla que se hace pasar a través de una estructura que tiene múltiples poros interconectados no está limitada particularmente, y puede seleccionarse basándose en el rendimiento deseado. Los inventores han descubierto que velocidades lineales superficiales más bajas de un líquido de la invención (por ejemplo, la mezcla usada según la invención) que se hace pasar a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados proporcionan distribuciones de tiempo de residencia más estrechas que velocidades lineales superficiales más altas. Por tanto, la velocidad lineal superficial en el método para incubar según la presente invención es preferiblemente igual a o menor de 600 cm/h, o igual a o menor de 300 cm/h, o igual a o menor de 200 cm/h, o igual a o menor de 100 cm/h, o igual a o menor de 50 cm/h, o igual a o menor de 20 cm/h. Lo más preferiblemente, la velocidad lineal superficial es igual a o menor de 50 cm/h.

Tal como conocerá un experto en la técnica, el número de Bodenstein puede usarse como medida de la distribución de tiempo de residencia. Un número de Bodenstein pequeño es indicativo de una distribución de tiempo de residencia amplia, y un número de Bodenstein grande es indicativo de una distribución de tiempo de residencia estrecha. Tal como se describió anteriormente, en el método para incubar según la presente invención, es muy preferible que la mezcla que pasa a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados tenga una distribución de tiempo de residencia estrecha. Por consiguiente, en el método para incubar según la presente invención, es preferible que el número de Bodenstein de la mezcla que pasa a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados sea igual a o mayor de 50, más preferiblemente igual a o mayor de 300, todavía más preferiblemente igual a o mayor de 400, todavía más preferiblemente igual a o mayor de 500, todavía más preferiblemente igual a o mayor de 600, lo más preferiblemente igual a o mayor de 800.

Un ejemplo para un procedimiento en el que se incuban líquidos (por ejemplo, mezclas de al menos dos líquidos) durante un periodo de tiempo definido mientras se hacen pasar a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados es la inactivación de virus continua. Por tanto, en una realización preferida de la presente invención, el método para incubar según la presente invención es para la inactivación de virus continua. En esta realización preferida, un primer líquido de dichos al menos dos líquidos es un líquido que contiene potencialmente un virus, y un segundo líquido de dichos al menos dos líquidos comprende un agente de inactivación de virus. Cuando se incuba la mezcla de un líquido que contiene potencialmente un virus y un líquido que comprende un agente de inactivación de virus, el tiempo de incubación puede seleccionarse de

manera que sea lo suficientemente largo como para lograr un valor de reducción Log₁₀ (LRV) suficiente para un virus dado. Por otro lado, el tiempo de incubación también se selecciona preferiblemente de manera que sea lo suficientemente corto como para garantizar que otros componentes que puedan estar contenidos en los líquidos (por ejemplo, un producto biofarmacéutico) no resulten dañados por el agente de inactivación de virus. Si para todas (o al menos para la mayoría de) las partes del líquido (por ejemplo, una mezcla de al menos dos líquidos) el tiempo de incubación es similar, entonces puede lograrse más fácilmente un tiempo de incubación adecuado que no sea ni corto, ni demasiado largo. Por tanto, las distribuciones de tiempo de residencia estrechas que se obtienen según la invención son ventajosas porque permiten, por ejemplo, seleccionar tales tiempos de incubación adecuados.

En procedimientos de producción de productos biofarmacéuticos, los virus en la mezcla que contienen el fármaco biofarmacéutico normalmente se inactivan para garantizar que después de la formulación del fármaco biofarmacéutico para dar una composición farmacéutica, la composición farmacéutica no supondrá ningún daño para los pacientes. Por tanto, el método o procedimiento para la inactivación de virus según la presente invención es particularmente útil en procedimientos de producción de productos biofarmacéuticos. Por consiguiente, en una realización preferida del método o procedimiento para la inactivación de virus según la presente invención, el primer líquido de la mezcla de al menos dos líquidos que se hace pasar a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados comprende un fármaco biofarmacéutico. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un método para preparar un fármaco biofarmacéutico, en el que dicho fármaco biofarmacéutico se recupera después de realizar el método para incubar según la presente invención.

Un experto en la técnica conoce bien los métodos para recuperar un fármaco biofarmacéutico que puede usarse de manera adecuada después de realizar el método para incubar según la presente invención. Por ejemplo, pueden usarse diversos métodos de cromatografía para recuperar un fármaco biofarmacéutico. Tales métodos pueden seleccionarse por un experto en la técnica teniendo en cuenta las propiedades del fármaco biofarmacéutico, la fuente de la que se obtiene (por ejemplo, de manera recombinante o a partir de otras fuentes tales como de plasma humano) y la aplicación biofarmacéutica deseada (por ejemplo, si se administrará por vía subcutánea o intravenosa, etc.).

Los fármacos biofarmacéuticos según la invención no están limitados particularmente. Incluyen tanto fármacos biofarmacéuticos recombinantes como fármacos biofarmacéuticos procedentes de otras fuentes tales como fármacos biofarmacéuticos obtenidos de plasma humano. Los fármacos biofarmacéuticos según la invención incluyen, sin limitación, factores sanguíneos, inmunoglobulinas, enzimas de sustitución, vacunas, vectores de terapia génica, factores de crecimiento y sus receptores. Los factores sanguíneos preferidos incluyen factor I (fibrinógeno), factor II (protrombina), factor tisular, factor V, factor VII y factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, factor de von Willebrand (VWF), precalicreína, cininógeno de alto peso

molecular (HMWK), fibronectina, antitrombina III, cofactor II de la heparina, proteína C, proteína S, proteína Z, plasminógeno, alfa 2-antiplasmina, activador tisular del plasminógeno (tPA), urocinasa, inhibidor 1 del activador de plasminógeno (PAI1) e inhibidor 2 del activador de plasminógeno (PAI2). Los factores sanguíneos que pueden usarse según la presente invención pretenden incluir variantes de polipéptidos funcionales y polinucleótidos que codifican para los factores sanguíneos o que codifican para tales polipéptidos variantes funcionales. Las inmunoglobulinas preferidas incluyen inmunoglobulinas del plasma humano, anticuerpos monoclonales y anticuerpos recombinantes. Los fármacos biofarmacéuticos según la invención son preferiblemente las proteínas humanas o humanas recombinantes respectivas o variantes funcionales de las mismas.

Tras la recuperación del fármaco biofarmacéutico obtenido mediante el método para preparar un fármaco biofarmacéutico según la presente invención, el fármaco biofarmacéutico puede formularse para dar una composición farmacéutica. Tal composición farmacéutica puede prepararse según normas conocidas para la preparación de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, la composición puede prepararse de manera que puede almacenarse y administrarse de manera apropiada, por ejemplo mediante el uso de componentes farmacéuticamente aceptables tales como portadores, excipientes o estabilizadores. Tales componentes farmacéuticamente aceptables no son tóxicos en las cantidades usadas cuando se administra la composición farmacéutica a un paciente.

En relación con todas las realizaciones del método o procedimiento para la inactivación de virus según la presente invención, dicho método o procedimiento es preferiblemente un método o procedimiento para la inactivación de virus continua.

Particularmente en el método o procedimiento para la inactivación de virus según la presente invención, puede ser ventajoso monitorizar el tiempo de residencia del líquido en la estructura que tiene múltiples canales interconectados, y su distribución de tiempo de residencia. Una monitorización de este tipo permitiría reconocer si cualquier parte dada del líquido de la mezcla que se hace pasar a través de la estructura que tiene múltiples canales interconectados no pasa suficiente tiempo en la estructura que tiene múltiples canales interconectados. En el método para la inactivación de virus continua según la presente invención, puede ser ventajoso reconocer si cualquier parte dada del líquido de la mezcla que se hace pasar a través de la estructura que tiene múltiples canales interconectados no pasa suficiente tiempo en la estructura que tiene múltiples canales interconectados, porque en tal caso el primer líquido (por ejemplo que comprende un fármaco biofarmacéutico) puede no exponerse al agente de inactivación de virus durante un tiempo suficiente para lograr el valor de reducción Log10 deseado para un virus dado. En tal caso, el experto podría modificar el método o procedimiento para la inactivación de virus según la invención, por ejemplo aumentando la longitud de la estructura que tiene múltiples canales interconectados y/o reduciendo la velocidad lineal superficial.

En el método o procedimiento para la inactivación de virus según la presente invención, con el fin de monitorizar el tiempo de residencia del líquido en la estructura que tiene múltiples canales interconectados y su distribución de tiempo de residencia, puede añadirse periódicamente una muestra indicadora aguas arriba de la estructura que tiene múltiples canales interconectados. Por ejemplo, puede añadirse periódicamente una muestra indicadora a un primer líquido, que posteriormente se mezcla con un segundo líquido y opcionalmente con líquidos adicionales. Alternativamente, puede añadirse periódicamente una muestra indicadora a la mezcla de al menos dos líquidos y mezclarse con dicha mezcla. Posteriormente, cuando la mezcla que comprende el indicador se hace pasar a través de la estructura que tiene múltiples canales interconectados según la presente invención, puede monitorizarse la concentración del indicador en la mezcla aguas arriba y aguas abajo de la estructura que tiene múltiples canales interconectados. Esta monitorización puede llevarse a cabo mediante cualquier método adecuado. Un experto en la técnica conoce métodos analíticos adecuados. Tales métodos pueden basarse, por ejemplo, en detección de fluorescencia, detección de absorbancia o resonancia magnética nuclear (RMN). Por consiguiente, en una realización preferida, el método o procedimiento para la inactivación de virus según la presente invención comprende una etapa de monitorización de tiempo de residencia y distribución de tiempo de residencia del líquido (por ejemplo la mezcla de al menos dos líquidos usada según la invención) en la estructura que tiene múltiples canales interconectados, comprendiendo dicha etapa la adición periódica de una muestra indicadora en dicho líquido (por ejemplo en dicha mezcla de al menos dos líquidos usada según la invención) y la monitorización de la concentración de dicho indicador en dicho líquido (por ejemplo en dicha mezcla de al menos dos líquidos usada según la invención) aguas arriba y aguas abajo de la estructura que tiene múltiples canales interconectados. Esta etapa es ventajosa porque permite monitorizar la calidad de la estructura que tiene múltiples canales interconectados durante un procedimiento de producción continuo, por ejemplo con el fin de detectar posibles obstrucciones u otras alteraciones de la estructura. Además, esta etapa también es ventajosa porque permite monitorizar si la distribución de tiempo de residencia de la estructura que tiene múltiples canales interconectados permanece suficientemente estrecha con el fin de proporcionar el LRV deseado, por ejemplo un LRV de 4.

En el método o procedimiento para la inactivación de virus según la presente invención, se prefiere que el agente de inactivación de virus sea una mezcla de disolvente/detergente adecuada para el tratamiento de inactivación de virus con disolvente/detergente. La mezcla de disolvente/detergente según la invención no está limitada particularmente. Por ejemplo, la mezcla de disolvente/detergente puede comprender un solo disolvente orgánico y una pluralidad de tensioactivos, una pluralidad de disolventes orgánicos y un solo tensioactivo, o una pluralidad de disolventes orgánicos y una pluralidad de tensioactivos. Se entiende que un experto puede elegir de manera apropiada el tipo de detergente y/o disolvente y sus concentraciones respectivas, teniendo en cuenta, por ejemplo, los posibles virus presentes en el líquido, el LRV deseado, las propiedades del fármaco biofarmacéutico y las características del procedimiento de fabricación del fármaco biofarmacéutico (por ejemplo a qué temperatura se llevará a cabo la inactivación). Normalmente, las concentraciones finales de un disolvente orgánico y un solo tensioactivo durante la incubación según la invención son de aproximadamente el 0,1% (v/v)

a aproximadamente el 5% (v/v) de disolvente orgánico y de aproximadamente el 0,1% (v/v) a aproximadamente el 10% (v/v) de tensioactivo. Cuando se usa una pluralidad de tensioactivos, la concentración final de un disolvente orgánico es de aproximadamente el 0,1% (v/v) a aproximadamente el 5% (v/v), la concentración final de un tensioactivo es de aproximadamente el 0,1% (v/v) a aproximadamente el 10% (v/v), de aproximadamente el 0,5% (v/v) a aproximadamente el 5% (v/v), o de aproximadamente el 0,5% (v/v) a aproximadamente el 1,0% (v/v), y la concentración final del resto de tensioactivos es de aproximadamente el 0,1% (v/v) a aproximadamente el 5% (v/v), de aproximadamente el 0,1% (v/v) a aproximadamente el 1,0% (v/v), o de aproximadamente el 0,2% (v/v) a aproximadamente el 4% (v/v).

En una realización de la presente invención, la mezcla de disolvente/detergente comprende fosfato de tri(n-butilo) y polioxietilén octil fenil éter (también conocido como, por ejemplo TRITON® X-100). En otra realización, la mezcla de disolvente/detergente comprende fosfato de tri(n-butilo) y monooleato de polioxietilensorbitano (80) (también conocido como, por ejemplo polisorbato 80 o TWEEN® 80).

En otra realización de la presente invención, la mezcla de disolvente/detergente comprende fosfato de tri(n-butilo), polioxietilén octil fenil éter (TRITON® X-100), y monooleato de polioxietilensorbitano (80) (también conocido como, por ejemplo polisorbato 80 o TWEEN® 80).

En una realización preferida del método o procedimiento para la inactivación de virus según la presente invención, se mezclan un primer líquido que comprende un fármaco biofarmacéutico y un segundo líquido que comprende una mezcla de disolvente/detergente adecuada para el tratamiento de inactivación de virus con disolvente/detergente y la mezcla se hace pasar posteriormente a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados. Tal como resultará evidente para un experto en la técnica, las concentraciones de uno o más componentes de la mezcla para el tratamiento de inactivación de virus con disolvente/detergente pueden monitorizarse en la mezcla que se hace pasar a través de la estructura que tiene múltiples canales interconectados, por ejemplo aguas arriba de la estructura que tiene múltiples poros interconectados, o aguas abajo de la estructura que tiene múltiples poros interconectados. Por ejemplo, uno o más componentes de la mezcla que se hace pasar a través de la estructura con múltiples canales interconectados puede rastrearse usando espectroscopía UV VIS y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), que conoce bien un experto en la técnica.

Alternativamente, en el método para la inactivación de virus continua según la presente invención, el agente de inactivación de virus puede ser una disolución ácida adecuada para el tratamiento de inactivación de virus a pH bajo. Una disolución ácida adecuada para el tratamiento de inactivación de virus a pH bajo puede comprender cualquier ácido orgánico o inorgánico adecuado para el tratamiento de inactivación de virus a pH bajo.

En el método o procedimiento para la inactivación de virus según la presente invención, es preferible que el método logre al menos un valor de reducción Log10 de 1 (LRV) para al menos un virus, o al menos un valor de reducción Log10 (LRV) de 2 para al menos un virus, o al menos un valor de reducción Log10 (LRV) de 3 para al menos un virus, o al menos un valor de reducción Log10 (LRV) de 4 para al menos un virus, o al menos un valor de reducción Log10 (LRV) de 5 para al menos un virus, o al menos un valor de reducción Log10 (LRV) de 6 para al menos un virus, o al menos un valor de reducción Log10 (LRV) de 7 para al menos un virus, o al menos un valor de reducción Log10 (LRV) de 8 para al menos un virus, lo más preferiblemente al menos un valor de reducción Log10 (LRV) de 4 para al menos un virus. Naturalmente, es evidente para un experto en la técnica que es beneficioso cualquier valor de reducción Log10 (LRV) para al menos un virus, porque mejora la seguridad de por ejemplo el procedimiento de producción de productos biofarmacéuticos. Los LRV a los que se hace referencia según la invención son preferiblemente LRV de un virus con envoltura.

El valor de reducción Log10 (LRV) que se logra mediante el método para la inactivación de virus continua según la presente invención se determina tal como conoce un experto en la técnica. Por ejemplo, el LRV puede determinarse mediante la determinación de la concentración de partículas víricas infecciosas en un líquido antes y después de someter el líquido al método para la inactivación de virus continua según la presente invención. Más específicamente, el LRV puede determinarse mediante la determinación de la concentración de partículas víricas infecciosas en un primer líquido, el mezclado del primer líquido con un segundo líquido que comprende un agente de inactivación de virus con el fin de someter el primer líquido al método para la inactivación de virus continua según la presente invención, y la determinación de la concentración de partículas víricas infecciosas en la mezcla del primer líquido y el segundo líquido después de realizar el método para la inactivación de virus continua según la presente invención. Tras la determinación de las concentraciones de partículas víricas infecciosas antes y después de la inactivación de virus, el LRV para cualquier virus dado puede determinarse mediante el cálculo del logaritmo (en base 10) de la razón de las partículas víricas infecciosas antes de la inactivación de virus (=concentración de partículas víricas infecciosas antes de la inactivación de virus * volumen antes de la inactivación de virus, por ejemplo volumen de primer líquido) con respecto a las partículas víricas infecciosas después de la inactivación de virus (=concentración de partículas víricas infecciosas después de la inactivación de virus, por ejemplo en mezcla de líquidos primero y segundo * (volumen después de la inactivación de virus, por ejemplo volumen de primer líquido + volumen de segundo líquido)).

El experto conoce numerosos métodos para determinar las concentraciones de partículas víricas infecciosas en un líquido. Por ejemplo, y sin limitación, las concentraciones de partículas víricas infecciosas en un líquido pueden medirse preferiblemente mediante ensayo en placa o mediante el ensayo de TCID₅₀, más preferiblemente mediante el ensayo de TCID₅₀.

Tal como conocerá un experto en la técnica, la inactivación de virus mediante el mezclado de un líquido con una mezcla de disolvente/detergente adecuada para el tratamiento de inactivación de virus con disolvente/detergente y la inactivación de virus mediante el mezclado de un líquido con una disolución ácida adecuada para el tratamiento de inactivación de virus a pH bajo, son particularmente eficaces para inactivar virus con envoltura. Por tanto, en una realización preferida, el método o procedimiento para la inactivación de virus según la presente invención es para la inactivación de virus continua de virus con envoltura.

La presente invención también divulga un dispositivo para la preparación de un fármaco biofarmacéutico según los métodos de la presente invención. Dicho dispositivo comprende un lecho de relleno de perlas no porosas. Puesto que el dispositivo que incluye el lecho de relleno de perlas no porosas se usa preferiblemente en un método según la presente invención, el lecho de relleno de perlas comprendido en el dispositivo tiene preferiblemente las mismas realizaciones que el lecho de relleno de perlas no porosas para su uso según la presente invención tal como se describió anteriormente.

En el método para preparar un fármaco biofarmacéutico según la presente invención, se mezclan un primer líquido que comprende un fármaco biofarmacéutico y un segundo líquido que comprende un agente de inactivación de virus y la mezcla se hace pasar posteriormente a través de una estructura que tiene múltiples canales interconectados. En una realización opcional de la presente invención, puede usarse un mezclador estático para mezclar los al menos dos líquidos antes de hacer pasar la mezcla a través de la estructura que tiene múltiples canales interconectados. Por tanto, en una realización de la invención, el dispositivo para la preparación de un fármaco biofarmacéutico según la presente invención comprende un mezclador estático. En un aspecto preferido de esta realización, dicho mezclador estático está ubicado aguas arriba del lecho de relleno de perlas no porosas. En un aspecto preferido adicional de esta realización, dicha mezcla estática es un mezclador de unión en T.

En el método para preparar un fármaco biofarmacéutico según la presente invención, la mezcla de al menos dos líquidos puede contener desechos, por ejemplo desechos celulares, u otros componentes insolubles procedentes del procedimiento de producción de productos biofarmacéuticos aguas arriba. Por tanto, puede desearse retirar dichos componentes insolubles de la mezcla por ejemplo mediante filtración. Por consiguiente, en una realización de la invención, el dispositivo para la preparación de un fármaco biofarmacéutico según la presente invención comprende un filtro. En un aspecto preferido de esta realización, dicho filtro está ubicado aguas arriba del lecho de relleno de perlas no porosas. En un aspecto incluso más preferido de esta realización, el filtro está ubicado aguas arriba del lecho de relleno de perlas no porosas, y aguas abajo de un mezclador, tal como un mezclador de unión en T o un mezclador dinámico. El tamaño de poro del filtro no está limitado particularmente y se seleccionará por un experto en la técnica, por ejemplo teniendo en cuenta el tamaño del fármaco biofarmacéutico que es necesario que pase por el filtro y el tamaño de los componentes (por ejemplo los desechos celulares u otros componentes insolubles procedentes del procedimiento de producción de

productos biofarmacéuticos aguas arriba) que deben retirarse del procedimiento. En una realización preferida, el filtro tiene un tamaño de poro de $0,2\ \mu\text{m}$.

En otra realización según las realizaciones anteriores, el dispositivo para la preparación de un fármaco biofarmacéutico según la presente invención es un reactor de flujo continuo, que comprende un lecho de relleno de perlas no porosas. Tal como resultará evidente para un experto en la técnica, el reactor según la presente invención puede combinarse con las demás realizaciones del dispositivo para la preparación de un fármaco biofarmacéutico según la presente invención. Por ejemplo, el reactor puede comprender un mezclador tal como un mezclador de unión en T aguas arriba del lecho de relleno de perlas no porosas. Alternativamente, el reactor puede comprender un filtro, por ejemplo un filtro con un tamaño de poro de $0,2\ \mu\text{m}$, aguas arriba del lecho de relleno de perlas no porosas. Como otra alternativa, el reactor puede comprender un filtro, por ejemplo un filtro con un tamaño de poro de $0,2\ \mu\text{m}$, aguas arriba del lecho de relleno de perlas no porosas, y un mezclador tal como un mezclador de unión en T aguas arriba del filtro. En un aspecto preferido de esta realización, el reactor es una columna, que comprende un filtro, por ejemplo un filtro con un tamaño de poro de $0,2\ \mu\text{m}$, aguas arriba del lecho de relleno de perlas no porosas, y un mezclador estático tal como un mezclador de unión en T aguas arriba del filtro.

En una realización según las demás realizaciones de la invención, el reactor de flujo continuo es adecuado para la inactivación de virus continua. El reactor de flujo continuo para la inactivación de virus continua de la invención comprende preferiblemente mezcladores para dos líquidos, de tres líquidos, o de cuatro o más líquidos que están conectados al lecho de relleno de perlas no porosas. Estos mezcladores están situados aguas arriba del lecho de relleno de perlas no porosas de manera que los líquidos pueden mezclarse antes de entrar en el lecho de relleno de perlas no porosas. En la figura 17 se facilitan ejemplos no limitativos de tales configuraciones de mezclado. El orden de mezclado no está limitado particularmente. Por ejemplo, pueden mezclarse tres líquidos de modo que se mezclan dos líquidos antes de que se mezcle el tercer líquido con la mezcla resultante, o puede mezclarse cualquier número de líquidos antes la adición de líquidos adicionales. En la figura 18 se facilitan ejemplos no limitativos de tales configuraciones de mezclado.

El reactor de flujo continuo para la inactivación de virus continua de la invención comprende preferiblemente unidades adicionales aguas arriba del lecho de relleno de perlas no porosas, que pueden incluir un tanque de compensación. En realizaciones no limitativas, el tanque de compensación puede conectarse a una unidad de cromatografía discontinua aguas arriba del tanque de compensación, o a una unidad para cromatografía de carga a contracorriente aguas arriba del tanque de compensación, o a una unidad para cromatografía de lecho móvil simulada aguas arriba del tanque de compensación. En la figura 19 A se muestran ejemplos no limitativos de tales unidades aguas arriba del lecho de relleno de perlas no porosas. Alternativamente, el reactor de flujo continuo para la inactivación de virus continua de la invención comprende preferiblemente unidades adicionales aguas arriba del lecho de relleno de perlas no porosas, que incluyen una unidad para procesamiento directo

sin interrupciones sin tanque de compensación. En realizaciones no limitativas, la unidad para procesamiento directo sin interrupciones puede ser una unidad de cromatografía discontinua, una unidad para cromatografía de carga a contracorriente, o una unidad para cromatografía de lecho móvil simulada. En la figura 19 B se muestran ejemplos no limitativos de tales unidades aguas arriba del lecho de relleno de perlas no porosas.

El reactor de flujo continuo para la inactivación de virus continua de la invención comprende preferiblemente unidades adicionales aguas abajo del lecho de relleno de perlas no porosas incluyendo, pero sin limitarse a, una unidad para extracción con disolvente-detergente en modo a contracorriente, una unidad para extracción con disolvente-detergente en modo de flujo paralelo, una unidad de cromatografía discontinua, una unidad para cromatografía de carga a contracorriente y una unidad para cromatografía de lecho móvil simulada. En la figura 20 se muestran ejemplos no limitativos de tales unidades aguas abajo del lecho de relleno de perlas no porosas.

Se entenderá que las unidades descritas anteriormente del reactor para la inactivación de virus continua de la invención también puede usarse en relación con los procedimientos y métodos de la invención.

A continuación, la presente invención se ilustrará mediante ejemplos, sin limitarse a los mismos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Configuración general de experimentos de ruptura

Puede obtenerse la distribución de tiempo de residencia acumulativa en una columna rellena con perlas no porosas mediante los denominados experimentos de ruptura. Para los ejemplos de la presente invención, se realizaron experimentos de ruptura en las tres etapas:

1. Lavar la columna con tampón de equilibrado

En los experimentos de la presente invención, se usó agua para el equilibrado.

2. Lavar los tubos adicionales de la columna con tampón que contiene el analito acetona (con la válvula de la columna en derivación)

Si no se indica de otro modo, en los ejemplos de la presente invención se usó acetona al 2%. Se demostró que la acetona al 2% era un sistema modelo adecuado para una mezcla que comprende la mezcla de disolvente/detergente adecuada para el tratamiento de inactivación de virus con disolvente/detergente según la presente invención (véase el ejemplo 2). Usar un sistema de acetona en lugar de una mezcla que comprende la mezcla de disolvente/detergente permitió un trabajo de laboratorio más conveniente. Cuando estuvo indicado, se realizaron experimentos adicionales con acetona al 10% para mayor sensibilidad.

3. Comenzar la medición de ruptura cambiando la válvula de la columna a la columna seleccionada

Se detectó la respuesta UV aguas abajo de la columna rellena con perlas no porosas usando un detector UV. La respuesta UV normalizada representa la distribución de tiempo de residencia acumulativa (figura 1A).

En los ejemplos de la presente invención, el detector UV se ajustó a una longitud de onda de 280 nm, a menos que se usara una mezcla que comprende la mezcla de disolvente/detergente adecuada para el tratamiento de inactivación de virus con disolvente/detergente según la presente invención. Si se usó la mezcla que comprende una mezcla de disolvente/detergente, el detector UV se ajustó a una longitud de onda de 300 nm, porque a la longitud de onda con la señal UV máxima (es decir a 280 nm), el detector UV se saturaba. Los experimentos de ruptura se realizaron en el sistema cromatográfico Aekta Avant de GE Healthcare a diferentes velocidades lineales superficiales que oscilaban entre 2 cm/h y 300 cm/h. Para los ejemplos de la presente invención, los espectros UV se procesaron con instrucciones de programa de procesamiento internas en el entorno de programación Matlab®. La respuesta UV se normalizó al intervalo de desde el 0% hasta el 100%.

El volumen de elución (EV) se expresa en volúmenes de columna (CV). Se calcularon los volúmenes de elución a diferentes concentraciones de la disolución de flujo continuo (acetona en agua) (por ejemplo volumen de elución al 5% y volumen de elución al 50%, véase la figura 1A).

Cuando se usan columnas rellenas, se espera que la asimetría de pico de baja intensidad sea más larga que el frente difuso de pico de baja intensidad. Sin embargo, en el método para la inactivación de virus continua según la presente invención, la asimetría de pico no fue tan relevante como el frente difuso de pico, porque la inactivación viral aumenta a lo largo del tiempo. Por tanto, la estrechez de los perfiles de UV obtenidos puede describirse preferiblemente mediante el siguiente parámetro:

$$\theta_x = \frac{EV_x}{EV_{50\%}}$$

$EV_{50\%}$ es la media de la distribución de tiempo de residencia, mientras que EV_x normalmente representa el volumen de elución cuando la señal alcanza el límite de detección fiable más bajo ("límite de detección", LOD). En los ejemplos de la presente invención, se usan comúnmente $EV_{1\%}$ y $EV_{5\%}$. Se entiende que independientemente de los presentes ejemplos, $EV_{1\%}$ y $EV_{5\%}$ pueden usarse generalmente según todas las realizaciones de la invención. Usando la configuración de estos ejemplos, pueden detectarse volúmenes de elución de tan solo $EV_{0,03\%}$ cuando se usa disolución de acetona al 10%. Si θ_x se aproxima a 1, la RTD es muy estrecha, es decir el flujo de líquido a través de la columna rellena con perlas no porosas se aproxima a al flujo pistón ideal. En cambio, si θ_x se aproxima a 0, la RTD es muy amplia, es decir la RTD muestra frente difuso de pico severo. En general, cuanto más cerca está θ_x de 1, más pronunciada es la curva de RTD.

Adicionalmente, para cada curva de ruptura, se calculó el número de Bodenstein ajustando la función F a la señal UV normalizada, donde $F(EV)$ representa la integral del pico gaussiano y Bo representa el número de Bodenstein, EV representa el volumen de elución en un punto de tiempo dado y $EV_{50\%}$ representa el volumen de elución en la media de la RTD:

$$F(EV) = \frac{1}{2} \left(\operatorname{erf} \left(\frac{1}{2} \sqrt{Bo} \left(\frac{EV}{EV_{50\%}} - 1 \right) \right) + 1 \right)$$

Tal como conoce un experto en la técnica, el número de Bodenstein también puede usarse como medida de la distribución de tiempo de residencia. Un número de Bodenstein pequeño es indicativo de una RTD amplia, mientras que un número de Bodenstein grande es indicativo de una RTD estrecha.

Ejemplo 2: Comparación de rendimiento entre acetona y mezcla que comprende disolventes/detergentes

Trabajar con mezclas de disolvente/detergente puede ser peligroso, lo que incomoda el trabajo de laboratorio. Por tanto, con el fin de permitir un trabajo de laboratorio más conveniente, se sometió a prueba si una disolución de acetona es un sistema modelo adecuado para una mezcla que comprende la mezcla de disolvente/detergente adecuada para el tratamiento de inactivación de virus con disolvente/detergente según la presente invención.

Se rellenaron diversas columnas con perlas de vidrio. Se realizaron experimentos de ruptura tal como se describió anteriormente (véase el ejemplo 1) usando una mezcla de acetona al 2% en agua, o una combinación de tampón de fluido de proceso y tampón de fluido de proceso con adición de productos químicos disolventes/detergentes. Se calcularon la razón de $EV_{5\%}$ con respecto a $EV_{50\%}$ ($\theta_{5\%}$) y los números de Bodenstein para cada experimento.

Tal como puede observarse en las figuras 2 y 3, $\theta_{5\%}$ y los números de Bodenstein fueron muy similares para los experimentos, que diferían en si se usó una mezcla de acetona al 2% en agua o una combinación de tampón de fluido de proceso y tampón de fluido de proceso con productos químicos disolventes/detergentes. Por tanto, sólo se usó la combinación de agua y acetona al 2% en los experimentos adicionales, a menos que se indicara de otro modo.

Ejemplo 3: Influencia de los parámetros de la columna sobre la distribución de tiempo de residencia

Con el fin de investigar la influencia de diversos parámetros de columnas rellenas con perlas no porosas sobre la distribución de tiempo de residencia, se analizaron los datos resumidos en la figura 2 con respecto a las alturas de columna, los diámetros de la columna, las velocidades lineales, los diámetros de las perlas y los intervalos de diámetros de las perlas. Generalmente, en relación con la presente invención, los términos “altura” y “longitud” se usan de manera intercambiable y siempre significan la altura de la estructura, por ejemplo la altura del lecho de relleno.

Específicamente, se realizó un análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) en los datos resumidos en la figura 2 para los parámetros de entrada (altura de la columna, volumen de la columna, velocidad lineal, diámetro medio de las perlas, distribución de diámetro de las perlas) y para dos parámetros de salida (número de Bodenstein y $\theta_{1\%}$). Se usó regresión ortogonal de PLS (OPLS) para representar la influencia de los parámetros de entrada individuales sobre la salida.

En este caso, OPLS es igual a PLS con el sistema de coordenadas girado para una representación más intuitiva (referencia 7). Más particularmente, puede observarse la influencia de los parámetros individuales sobre la salida desde el primer componente de OPLS. Los parámetros con valor positivo aumentan la salida si aumentan. Los parámetros con valor negativo disminuyen la salida si se disminuyen. Si el valor absoluto del primer componente de OPLC de un determinado parámetro es alto, entonces el parámetro tiene una alta

influencia sobre la salida. (El segundo componente de OPLS no es relevante en este caso – en una explicación simplificada podría interpretarse de manera que se refiera a la variabilidad de los parámetros).

La representación gráfica de los dos primeros componentes principales reveló que la influencia de las dimensiones de las partículas de perlas es el parámetro más significativo en el intervalo investigado (figura 4). Cuando más pequeñas y más uniformes son las perlas, más estrecha es la RTD. Otro factor significativo fue la longitud de la columna. Las columnas más largas proporcionaron RTD más estrechas. Los factores menos influyentes fueron el volumen de la columna y la velocidad lineal. Esto último significa que para aumentar a escala, puede cambiarse el diámetro de la columna y/o puede aumentarse el tiempo de residencia mediante el uso de velocidades lineales decrecientes con poca influencia sobre la RTD en el intervalo sometido a prueba. Sin embargo, se observó que velocidades lineales más bajas y volúmenes de columna más grandes dieron como resultado una RTD algo mejor. Las consideraciones anteriores fueron compatibles para ambos parámetros que describen la RTD, es decir el número de Bodenstein y $\theta_{1\%}$.

Se realizó otro experimento para confirmar la influencia de la longitud de la columna sobre RTD. Se rellenaron columnas de tamaños diferentes con perlas de cerámica del mismo lote, y se realizaron experimentos de ruptura a diversas velocidades lineales. En este experimento también se encontró que las columnas más cortas tienen un $\theta_{1\%}$ más bajo, es decir una RTD amplia (figura 5).

Se realizó otro experimento para confirmar la influencia de la velocidad de flujo lineal sobre la RTD. Se llenó una columna adecuada para el método de inactivación de virus continua según la presente invención ("MP_7_PMMA_HS_16/13.2_0.2-0.4mm; material: plástico de PMMA; diámetro: 16 mm; altura: 13,2 cm; tamaño de perla: $0,3 \mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$) usando una estación de rellenado de columnas vibratoria. Diferentes tiempos de flujo continuo deben dar como resultado diferentes caudales y por tanto diferentes RTD. Por tanto, la RTD se evaluó usando $EV_{1\%}/EV_{50\%}$ ($\theta_{1\%}$), en todo el intervalo de tiempos de flujo continuo desde 1 minuto hasta 30 minutos. Suponiendo una porosidad de $0,4 \pm 0,05$, la velocidad de flujo lineal superficial debe estar en el intervalo de entre 5 cm/h y 180 cm/h. En tal intervalo, la RTD se hace más ancha, es decir $\theta_{1\%}$ se hace más pequeño, hacia velocidades más altas (figura 6). En el intervalo de velocidades lineales sometidas a prueba, el rendimiento de la columna en lo que se refiere a $\theta_{1\%}$ cae en un 4%. En particular, la columna usada en este experimento es corta en comparación con lo que se espera usar en un procedimiento de producción de productos biofarmacéuticos. Puesto que las columnas más largas dan RTD más estrechas (véase anteriormente), en un procedimiento de producción de productos biofarmacéuticos, se espera una RTD incluso más estrecha.

Ejemplo 4: Predicción de la influencia de los parámetros de la columna y la velocidad de flujo lineal sobre la RTD

Poder predecir con precisión la influencia de los parámetros de la columna y la velocidad de flujo lineal sobre la RTD es importante por ejemplo cuando se amplían a escala las columnas para su integración en un procedimiento de producción de productos biofarmacéuticos. Se realizó la predicción de PLS de RTD para los 5 parámetros de entrada (longitud de las columnas, volumen de la columna, velocidad de flujo lineal, diámetro medio de las perlas e intervalo de diámetro de la perla), y para los mismos parámetros de entrada excepto la velocidad lineal. Tal como puede observarse en las figuras 5 y 6, respectivamente, predecir la influencia de los parámetros de entrada sobre la RTD usando el modelo de predicción de PLS se correlacionó bien con los datos experimentales observados, independientemente de si se usó $EV_{1\%}$ con respecto a $EV_{50\%}$ ($\theta_{1\%}$) o los números de Bodenstein para evaluar la RTD. Sin embargo, $\theta_{1\%}$ se correlacionó más linealmente con los parámetros de entrada que el número de Bodenstein.

Ejemplo 5: Influencia del relleno de columna sobre la RTD

Para evaluar la influencia del relleno de columna sobre la RTD, se rellenaron a mano columnas del mismo diámetro (1 cm) y longitudes similares (desde 28,5 cm hasta 30,5 cm) con perlas de cerámica. Una de ellas (JS_07) se rellenó más a propósito, es decir contenía muchas burbujas de aire después del rellenado. A velocidades lineales superficiales bajas, la columna mal rellenada rindió de manera similar a las columnas bien rellenadas con tamaños de perlas más grandes (figura 7). Sin embargo, a velocidades lineales superficiales superiores, la columna mal rellenada rindió mucho peor, es decir $\theta_{1\%}$ fue mucho menor, lo que indica una RTD amplia. Estos resultados muestran que la calidad de relleno de la columna afecta a la RTD. En particular, puede realizarse relleno de columna de alta calidad usando por ejemplo una estación de vibración a medida.

Ejemplo 6: Reducción del límite de detección

Usando acetona al 2%, el límite de detección (LOD) en los experimentos de ruptura está en el intervalo del 1% del volumen de elución ($EV_{1\%}$). Sin embargo, el método para la inactivación de virus continua según la presente invención preferiblemente logra un valor de reducción Log_{10} (LRV) de al menos 4. Un LRV de 4 sería equivalente a una reducción desde el 100% de partículas víricas infecciosas hasta el 0,01% de partículas víricas infecciosas. Con respecto a esto, el límite de detección de $EV_{1\%}$ es relativamente grande.

Con el fin de lograr un LOD más bajo, se usó acetona al 10%. En este caso, el LOD pudo fijarse al 0,03% a UV 280 nm. Cuando los experimentos de ruptura se realizaron usando acetona al 10% y columnas rellenas con perlas de cerámica, $\theta_{0,03\%}$ ($EV_{0,03\%}/EV_{50\%}$) y $\theta_{1\%}$ ($EV_{1\%}/EV_{50\%}$) se correlacionaron muy bien, especialmente cuando se usaron columnas bien rellenadas (véase la figura 11). Por tanto, está justificado el uso de $\theta_{1\%}$ para evaluar la influencia de diversos parámetros sobre la RTD. En particular, podrían usarse experimentos de fluorescencia para obtener límites de detección incluso más bajos.

Ejemplo 7: Comparación con métodos conocidos

En los métodos conocidos, se han usado inversores de flujo helicoidales (CFI) para lograr una RTD estrecha. Sin embargo, la capacidad de ampliación a escala del lecho de relleno de perlas no porosas según la presente es mucho mejor que la capacidad de ampliación a escala de los CFI, porque para el lecho de relleno de perlas no porosas, la RTD se hace más estrecha cuando se usan lechos más largos, y el lecho no es muy sensible a cambios en los caudales. En cambio, los CFI sólo se ha demostrado que funcionan con diámetros de tubo de 2-3 mm, y las capacidades de ampliación a escala son cuestionables debido a una dinámica de fluidos no ideal. Además, los CFI se limitan a un solo caudal para cada diseño dado.

Con el fin de comparar la RTD de los CFI con la RTD de las columnas rellenas con perlas no porosas según la presente, se compararon los números de Bodenstein obtenidos con los CFI y publicados en Klutz *et al.* (referencia 2) con los números de Bodenstein logrados mediante las columnas rellenas de la presente invención. Sorprendentemente, los números de Bodenstein de columnas con diámetros de más de 5 mm, longitudes de más de 10 cm, y con perlas eran más pequeñas de 600 μm de diámetro fueron mayores que los números de Bodenstein de los CFI descritos en los métodos conocidos, independientemente de si se usaron perlas de vidrio (figura 11), perlas de cerámica (figura 12) o perlas de plástico de PMMA (figura 13).

Ejemplo 8: Distribución del tiempo de residencia para columnas de la invención y columnas comparativas a diferentes tamaños de columna

A continuación, los inventores investigaron la influencia del tamaño de las columnas sobre la distribución de tiempo de residencia y también compararon las columnas de la invención con las columnas del inversor de flujo convertido (CFI). Los resultados se muestran en la figura 21. En la figura 21 A, cada círculo representa un experimento. El tamaño del círculo es proporcional al número de Bodenstein. Por tanto, cuanto mayor es el círculo mayor es el número de Bodenstein, lo que significa que más cerca está el sistema del flujo pistón ideal. En el eje x, se muestra el tiempo de residencia medio (o flujo a través del tiempo), y en el eje y se muestra el caudal. Los círculos vacíos representan experimentos con columnas rellenas según la invención, y los círculos rellenos representan los datos de un inversor de flujo helicoidal (CFI) comparativo. Las líneas discontinuas representan la trayectoria que se obtendría mientras se usa un único reactor (o múltiples reactores con los mismos volúmenes de vacío) a diferente caudales. El fin de este gráfico es poner la comparación en perspectiva con respecto al caudal usado y al tamaño del reactor, ya que sería inapropiado comparar los números de Bodenstein entre dos métodos realizados a caudales muy diferentes o a una escala diferente.

Aunque los inventores ya han demostrado que las columnas según la invención tienen volúmenes de vacío más pequeños que las configuraciones de CFI y que la distribución de tiempo de residencia (RTD) se estrecha con la ampliación a escala de la columna, los inventores también realizaron una comparación directa adicional en forma de gráfico. En el gráfico de la figura 21 A, también se muestran los resultados de una columna rellena grande. Aunque las otras columnas tenían volúmenes de vacío más pequeños que la mayoría de las configuraciones de CFI presentadas, esta columna grande era más grande que todas las de las configuraciones

de CFI. La columna grande supera sustancialmente a todas las columnas más pequeñas (escala de laboratorio), así como a todas las configuraciones de CFI (obsérvese que los círculos en blanco más grandes pertenecen a la columna grande).

La figura 21 B es igual que la figura 21 A, excepto en que las escalas están en forma logarítmica. Por tanto, los experimentos con el mismo volumen de vacío (mismo reactor) se encuentran en línea recta.

Los experimentos, que se realizaron para la columna grande, se representan en más detalle en la figura 21 C. En particular, se rellenó una columna (GE Healthcare XK 50/100) con diámetro de 5 cm y longitud de 89 cm con perlas de cerámica con un diámetro de entre 125 μm y 250 μm . El volumen total de la columna rellena fue de 1,75 l, y el volumen de vacío fue de 0,7 L. La columna se rellenó usando una estación de rellenado de columnas con vibración. El fin era confirmar la tendencia de una distribución de tiempo de residencia (RTD) más estrecha con ampliación a escala de la columna, así como demostrar una RTD estrecha también para una columna más grande que los reactores de inversor de flujo helicoidal (CFI) comparativos.

Los experimentos se realizaron con una velocidad lineal superficial de 5 cm/h, 10 cm/h, 15 cm/h, 20 cm/h y 30 cm/h. El intervalo de caudales volumétricos fue todavía más amplio en el límite superior e inferior que para los caudales usados en los reactores de CFI.

La columna grande produjo una RTD muy estrecha, tal como se esperaba según la invención (figura 21 C). En comparación, una columna más pequeña ($d = 26 \text{ mm}$, $l = 19,5 \text{ cm}$) rellena con el mismo lote de perlas logró una puntuación de $EV_{1\%}/EV_{50\%}$ en el intervalo de 0,88 – 0,92 y un número de Bodenstein en el intervalo de 800 – 1800.

Ejemplo 9: Realización a modo de ejemplo del dispositivo para la preparación de un fármaco biofarmacéutico

En la figura 14 se muestra una realización a modo de ejemplo del dispositivo para la preparación de un fármaco biofarmacéutico. El fluido de proceso se mezcla con disoluciones madre de los productos químicos disolventes/detergentes individuales. Las balanzas proporcionan control de retroalimentación para garantizar los caudales correctos de todos los componentes para lograr las concentraciones finales deseadas. Los mezcladores en línea homogeneizan las disoluciones. La disolución homogénea entra en la columna de inactivación después de hacerse pasar a través de un filtro absoluto (por ejemplo un filtro de 0,2 µm) para retirar las partículas.

Ejemplo 10: Enfoque matemático para estimar la inactivación de virus

Klutz et al. Sugirieron dos enfoques para reivindicar la inactivación viral para configuraciones continuas (referencia 3). El primer enfoque se basa en la detección del inicio del pico (con límite de detección fijado al 0,5% de ruptura), donde el tiempo de elución del inicio del pico debe ser igual que el tiempo de inactivación viral en el reactor discontinuo correspondiente. El 99,5% del fluido de proceso tendría un tiempo de incubación más prolongado que en el procedimiento discontinuo y por tanto, se espera que el valor de reducción logarítmica (LRV) de la configuración continua sea mayor que en el funcionamiento discontinuo.

$$LRV = \log_{10} \frac{\text{Titulo de virus antes de la inactivación}}{\text{Titulo de virus después de la inactivación}}$$

El segundo enfoque es suponer una naturaleza exponencial de la inactivación viral (que se confirma mediante resultados cinéticos de inactivación discontinua experimental). El LRV efectivo para el segundo enfoque se define como el LRV promedio ponderado por la distribución de tiempo de residencia (RTD). Este enfoque permite entonces tiempos de residencia más cortos en el reactor porque el objetivo es alcanzar el mismo LRV que el funcionamiento discontinuo. Sin embargo, las sugerencias no fueron acompañadas por los cálculos.

El comienzo del pico de RTD es una parte crítica, ya que los virus que eluyen pronto justo en el comienzo del pico tienen un tiempo de incubación relativamente corto. El estudio del comienzo del pico no se consideró en los métodos conocidos en la técnica.

En el método basado en columnas rellenas de la presente invención, se sugiere por tanto dividir el perfil de ruptura en dos secciones: antes y después de poder detectar el comienzo de la curva de ruptura. Esto se produce una vez que la señal supera el límite de detección (LOD) inferior. El perfil antes de la detección no se conoce. El perfil de ruptura representa la distribución de tiempo de residencia acumulativa, mientras que un

perfil de inyección de pulso representaría una distribución de tiempo de residencia normal. Por tanto, el tiempo de elución en el que la curva de ruptura se eleva por encima de LOD (tiempo de LOD, t_{inic}) es el tiempo en que eluiría la porción φ_{inic} del pico de RTD:

$$\varphi_{inic} = \text{LOD}(\text{señal UV}) / \text{máx}(\text{señal UV})$$

Si se supone que no hay inactivación viral en la parte inicial antes del límite de detección (φ_{inic}), entonces el límite de detección debe ser muy bajo con el fin de lograr el LRV requerido.

En la columna, no hay unión ni poros en las partículas, por lo que se espera que la RTD tenga sólo un pico. Si sólo hay un pico, el peor escenario teórico de caso con el tiempo de residencia promedio más bajo, mientras se supone un solo perfil de pico, sería una concentración de muestra constante antes de la elución del pico de elución detectable, es decir frente difuso de pico extremo (figura 15).

Suponiendo una naturaleza exponencial de la inactivación viral y el escenario de frente difuso de pico del peor caso descrito anteriormente, puede calcularse la razón de reducción de virus para φ_{inic} (indicado por RV_{inic}):

$$RV_{inic} = \frac{1 - \exp_{10}(-k t_{inic})}{k t_{inic} \ln(10)}$$

El coeficiente para la disminución de la inactivación viral exponencial (k) puede calcularse a partir del tiempo de incubación de inactivación viral discontinua requerido (t_0) y el límite inferior correspondiente para la inactivación viral (RV_{min} = valor de reducción).

$$RV_{min} = \exp_{10}(-k t_0)$$

El tiempo de incubación del material eluido después de LOD se ajusta al tiempo de LOD. El valor de reducción conjunto (RV_{total}) se calcula a partir de ambas contribuciones y debe ser igual a RV_{min} .

$$\begin{aligned} RV_{total} &= \varphi_{inic} * RV_{inic} + (1 - \varphi_{inic}) * \exp_{10}(-k t_{inic}) = \\ &= \varphi_{inic} * \frac{1 - \exp_{10}(-k t_{inic})}{k t_{inic} \ln(10)} + (1 - \varphi_{inic}) * \exp_{10}(-k t_{inic}) = RV_{min} \end{aligned}$$

A partir de la ecuación superior, puede calcularse el tiempo de LOD requerido para el RV_{min} requerido y para el LOD dado (figura 16).

Ejemplo etapa por etapa:

- 1) Anteriormente se demostró que puede lograrse $LOD < 0,03\%$ mediante el uso de acetona al 10% y un detector UV. Por tanto, en este ejemplo los inventores usaron $\phi_{inic}=0,03\%$, requirieron un LRV de 4 y un tiempo de incubación discontinua (t_0) de 1 hora. El tiempo de LOD requerido puede estimarse a partir del gráfico en la figura 16. Puede obtenerse un valor preciso resolviendo numéricamente la última ecuación. El valor estimado a partir del gráfico es de 1,05. $t_{inic}=1,05$; $t_0=1,05*60=63$ min.
- 2) Los inventores también han demostrado anteriormente que para $LOD < 0,03\%$, puede lograrse una razón entre el tiempo de LOD y el tiempo de residencia medio por encima de 0,8 ($EV_{0,03\%}/(EV_{50\%})=0,8$). Por tanto, el tiempo de residencia medio (t_{mean}) es: $t_{mean}=t_{LOD}/0,8=79$ min
- 3) Una porosidad típica es de $\approx 0,4$. Depende de la distribución del tamaño de partícula. Para este ejemplo puede tomarse que la porosidad es de $\approx 0,4$ y que $\Phi_{rendimiento}$ del método deseado ≈ 1 l/hora. En este caso, el volumen total de la columna (CV) debe ser:

$$CV = \frac{t_{medio} * \Phi_{rendimiento}}{\varepsilon} = 3,3 \text{ l}$$

Ejemplo 11: Inactivación de virus

Una inactivación de virus a modo de ejemplo según la invención puede llevarse a cabo tal como sigue. En el ejemplo a continuación, toda la configuración así como todas las disoluciones se realizan a temperatura ambiente. Todo el procedimiento de inactivación se realiza de manera continua.

Se mezcla de manera continua una disolución tamponada que contiene un producto proteico (MES 20 mM, $CaCl_2$ 10 mM, polisorbato 80 al 0,1%, NaCl 500 mM, pH 6,35) con una disolución madre de productos químicos disolventes-detergentes: fosfato de tri-n-butilo, Triton X-100 y polisorbato 80 (los porcentajes en masa de los tres productos químicos en la disolución madre: 17,47%:63,25%:19,28%). Se usó un mezclador dinámico en línea para mezclar las dos disoluciones. Los caudales volumétricos de las dos corrientes son 0,161 ml/min y 10,0 ml/min para la disolución madre de disolvente-detergente y para la corriente que contiene el producto, respectivamente. La mezcla homogénea resultante pasa a un filtro en línea para retirar cualquier material particulado. Entonces se alimenta la disolución directamente a la columna de inactivación rellena con perlas no porosas y un volumen de columna de 2134 ml. La altura de la columna es de 27,2 cm y el diámetro de la columna es de 10 cm. La columna es una columna equilibrada con tampón (MES 20 mM, $CaCl_2$ 10 mM, polisorbato 80 al 0,1%, NaCl 500 mM, pH 6,35) con la misma concentración de SD que la presente en la mezcla de disolución de producto y disolución madre de producto químico SD.

El flujo de salida de la columna de inactivación de virus se filtra a través de un filtro, se diluye en línea 1:4,5 con una disolución tampón (Tris 50 mM, CaCl₂ 5 mM, polisorbato 80 al 0,1%) y se carga en una columna de intercambio aniónico de gran calibre.

Ejemplo 12: Inactivación de virus (X-MuLV a S/D al 5%)

A continuación se describe un ejemplo experimental para inactivación viral continua (CVI), en el que se usó el procedimiento con disolvente/detergente (S/D), y en el que se comparó la inactivación viral continua con la incubación discontinua con S/D convencional en la industria.

Por consiguiente, los experimentos se realizaron con las directrices relevantes en la industria, tales como, pero sin limitarse a, la directriz ICH Q5A(R1) 1999, la directriz ICH CPMP/BWP/268/95 1996 y la directriz CHMP/BWP/398498/2005 2009 de la EMEA.

El título de virus se determinó mediante el método de la dosis infecciosa de cultivo celular al 50% (TCID₅₀). Un experto en la técnica evaluó el límite de detección (LOD) y la falta de interferencia de la muestra para la TCID₅₀.

Se usó el reactor de inactivación de virus continua (CVIR) para la inactivación viral en modo de funcionamiento continuo. El volumen del reactor (V_R) es equivalente a $EV_{1\%}$ y se evaluó mediante el análisis del tiempo de residencia. El reactor se diseñó y se hizo funcionar para proporcionar un tiempo de incubación de 30 y 60 min. El volumen antes del CVIR es pequeño en comparación con el volumen del CVIR y no se consideró en el análisis de distribución de tiempo de residencia.

En la figura 24 se representa la configuración usada para la inactivación de virus continua. En este ejemplo, se usaron dos bombas para bombear el elemento de prueba (un sustituto para el producto intermedio del procedimiento) y el reactivo de S/D, las dos corrientes convergieron en el mezclador en línea, donde se homogeneizaron. Una vez homogeneizadas, se bombeó adicionalmente una única corriente a través del CVIR, donde tuvo lugar la inactivación de virus de manera continua.

El CVIR era un tubo cilíndrico relleno con perlas no porosas esféricas de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) con diámetros que oscilaban entre 200 y 400 μm con un diámetro medio de 300 μm . El reactor se rellenó usando una estación de rellenado asistida por vibración a medida. El rellenado dio como resultado un reactor con una altura de relleno de 132 mm y un volumen de vacío de $10,66 \pm 0,06$ ml. El número de Bodenstein a 10 cm/h fue >875 . EV_1/EV_{50} a 10 cm/h fue de 0,882, por lo que se calculó que el volumen del CVIR era de $9,40 \pm 0,15$ ml.

El caudal en la entrada y la salida del CVIR fue tal que el tiempo de incubación fuera de 30 y 60 min, lo que dio como resultado velocidades lineales dentro del CVIR de 4,68 y 9,35 cm/h, respectivamente.

El procedimiento logró el estado estacionario antes de $2 V_R$ de funcionamiento y a $2 V_R$ el sistema ya estaba en estado estacionario. Una vez que la concentración de los componentes de S/D alcanzó la misma concentración que en la entrada, el sistema había logrado el estado estacionario, tal como se muestra en la figura 25. El procedimiento de CVI mostró una fase de latencia y un comienzo retardado del estado estacionario debido al desplazamiento de la fase líquida dentro del CVIR, que no contenía ninguno de los componentes de S/D, por lo que se produjo ninguna o inactivación de virus limitada.

El elemento de prueba consistió en un tampón relevante en la industria con albúmina sérica humana como ejemplo de un fármaco biofarmacéutico. El elemento de prueba en el presente ejemplo reproduce propiedades clave (pH, conductividad, proteína total) de un producto intermedio de procedimiento en un procedimiento para la producción de un fármaco biofarmacéutico. Un experto en la técnica añadió de antemano X-MuLV al elemento de prueba de acuerdo con las directrices relevantes.

El reactivo de S/D de este ejemplo no limitativo fue una mezcla de un disolvente y detergentes con efecto de inactivación de virus. En el presente ejemplo se usaron Triton X-100 (TX-100), polisorbato 80 (PS80) y fosfato de tri-n-butilo (TnBP). El reactivo de S/D se diluyó en el mezclador para lograr la concentración objetivo del 0,0473% (p/p) de TX-100, el 0,0144% (p/p) de PS80 y el 0,0131% (p/p) de TnBP durante la incubación de CVI.

Se extrajo una muestra del elemento de prueba añadido antes del comienzo del experimento de CVI para establecer el título de virus inicial. Se tomaron muestras de la corriente en la salida del CVIR a 1, 2, 3, 4 y 5 V_R . Las muestras de la salida se diluyeron inmediatamente 20 veces para detener el procedimiento de inactivación de virus y se valoraron inmediatamente para determinar el título de virus con el fin de establecer el título después del procedimiento de CVI. Se extrajo una muestra del elemento de prueba añadido después de completar el experimento de CVI para que sirviera como control de mantenimiento (HC).

Se midió la inactivación de virus calculando el valor de reducción logarítmica (LRV) como en la ecuación 1 a continuación. La ecuación 1 refleja la naturaleza específica del funcionamiento continuo y el hecho de que en este ejemplo hay dos corrientes que están bombeándose a través del CVIR y sólo sale una del CVIR. Por tanto, la entrada de virus por unidad de tiempo antes de la inactivación de virus y la salida de virus por unidad de tiempo después de la inactivación de virus se calculan basándose en el título de virus de la corriente y en su caudal volumétrico respectivo. El título_{salida} se corrigió para la dilución de detención de la inactivación de virus.

$$LRV = \log_{10} \left(\frac{\text{título}_{\text{elemento de prueba añadido}} \times \text{caudal}_{\text{elemento de prueba añadido}}}{\text{título}_{\text{salida}} \times \text{caudal}_{\text{salida}}} \right) \quad (1)$$

En la figura 26 se representa el perfil del título de X-MuLV después de 30 y 60 min del procedimiento de incubación de CVI. Una vez que la operación alcanzó el estado estacionario, el X-MuLV se redujo desde $\geq 6,3E+5$ TCID₅₀/ml en la entrada del CVIR hasta $\leq 4,0E+2$ TCID₅₀/ml en la salida del CVIR para el tiempo de incubación de 30 min y se redujo hasta $\leq 8,0E+1$ TCID₅₀/ml para el tiempo de incubación de 60 min. Antes de alcanzar el estado estacionario, es decir a 1 V_R , el título de X-MuLV de $2,5E+2$ TCID₅₀/ml fue mayor que los logrados en la fase de estado estacionario. Esta diferencia puede explicarse por la concentración de los componentes de S/D por debajo de la concentración objetivo a 1 V_R tal como se describió anteriormente.

Una vez en el estado estacionario (desde 2 V_R en adelante) se observó un LRV de $\geq 3,5$ para el tiempo de incubación de 30 min y un LRV de $>3,9$ para el tiempo de incubación de 60 min (figura 27 para la incubación de 30 y 60 min, el control de mantenimiento mostró una pérdida de virus por debajo de 1 log₁₀ (el valor de diferencia mínimo que un experto en la técnica va a considerar significativo y aceptado en las directrices relevantes en la industria).

Un experto en la técnica realizó experimentos discontinuos siguiendo las directrices relevantes en la industria para comparación. Los datos que resultan del procedimiento discontinuo tradicional (mostrado en la figura 28) mostraron un LRV $\geq 3,8$, que es comparable a los obtenidos en el CVIR en el modo de funcionamiento continuo. La comparación directa mostró que la inactivación de virus continua usando el CVIR es tan eficaz como el funcionamiento discontinuo tradicional.

Esto indica que la inactivación de virus continua según la invención es altamente ventajosa, porque es tan eficaz como las condiciones de inactivación ideales de inactivación viral en el modo discontinuo (por ejemplo esencialmente igual tiempo de residencia para todas las partes de la mezcla debido a una distribución de tiempo de residencia estrecha, lo que conduce a la inactivación viral eficaz en todas las partes de la mezcla), a la vez que se proporciona la ventaja adicional de que puede llevarse a cabo de manera continua.

Un experto en la técnica entenderá que las condiciones usadas en el ejemplo de inactivación viral no son limitativas del alcance de la invención. Por ejemplo, aunque se usaron perlas no porosas esféricas de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) con diámetros que oscilaban entre 200 y 400 μm con un diámetro medio de 300 μm como ejemplo, según la invención puede usarse cualquier estructura que tenga múltiples canales interconectados, por ejemplo cualquier columna rellena con perlas no porosas. De manera similar, aunque se usó un tubo cilíndrico relleno usando una estación de relleno asistida por vibración a medida como el CVIR que tenía una altura de relleno de 132 mm, un volumen de vacío de $10,66 \pm 0,06$ ml y un volumen de CVIR de $9,40 \pm 0,15$ ml, puede usarse cualquier otro CVIR tal como se define por la presente invención.

Ejemplo 13: Inactivación de virus (BVDV a S/D al 5%)

A continuación se describe un ejemplo experimental para inactivación viral continua (CVI), en el que se usó el procedimiento con disolvente/detergente (S/D), y en el que se comparó la inactivación viral continua con la incubación discontinua con S/D convencional en la industria.

Por consiguiente, los experimentos se realizaron con las directrices relevantes en la industria, tales como, pero sin limitarse a, la directriz ICH Q5A(R1) 1999, la directriz ICH CPMP/BWP/268/95 1996 y la directriz CHMP/BWP/398498/2005 2009 de la EMEA.

El título de virus se determinó mediante el método de la dosis infecciosa de cultivo celular al 50% (TCID₅₀). Un experto en la técnica evaluó el límite de detección (LOD) y la falta de interferencia de la muestra para la TCID₅₀.

Se usó el reactor de inactivación de virus continua (CVIR) para la inactivación viral en modo de funcionamiento continuo. El volumen del reactor (V_R) es equivalente a $EV_{1\%}$ y se evaluó mediante el análisis del tiempo de residencia. El reactor se diseñó y se hizo funcionar para proporcionar un tiempo de incubación de 30 y 60 min. El volumen antes del CVIR es pequeño en comparación con el volumen del CVIR y no se consideró en el análisis de distribución de tiempo de residencia.

En la figura 24 se representa la configuración usada para la inactivación de virus continua del ejemplo anterior. En este ejemplo, se usaron dos bombas para bombear el elemento de prueba (un sustituto para el producto intermedio del procedimiento) y el reactivo de S/D, las dos corrientes convergen en el mezclador en línea, donde se homogeneizaron. Una vez homogeneizadas, se bombeó adicionalmente una única corriente a través del CVIR, donde tuvo lugar la inactivación de virus de manera continua.

El CVIR era un tubo cilíndrico relleno con perlas no porosas esféricas de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) con diámetros que oscilaban entre 200 y 400 μm con un diámetro medio de 300 μm . El reactor se relleno usando una estación de relleno asistida por vibración a medida. El relleno dio como resultado un reactor con una altura de relleno de 132 mm y un volumen de vacío de $10,66 \pm 0,06$ ml. El número de Bodenstein a 10 cm/h fue >875 . EV_1/EV_{50} a 10 cm/h fue de 0,882, por lo que se calculó que el volumen del CVIR era de $9,40 \pm 0,15$ ml.

El caudal en la entrada y la salida del CVIR fue tal que el tiempo de incubación fuera de 30 y 60 min, lo que dio como resultado velocidades lineales dentro del CVIR de 4,68 y 9,35 cm/h, respectivamente.

El procedimiento logró el estado estacionario antes de 2 volúmenes de reactor (V_R) de funcionamiento y a $2 V_R$ el sistema ya estaba en estado estacionario. Una vez que la concentración de los componentes de S/D alcanzó la misma concentración que en la entrada, el sistema había logrado el estado estacionario, tal como se muestra en la figura 25 del ejemplo anterior. El procedimiento de CVI mostró una fase de latencia y un comienzo

retardado del estado estacionario debido al desplazamiento de la fase líquida dentro del CVIR, que no contenía ninguno de los componentes de S/D, por lo que se produjo ninguna o inactivación de virus limitada.

El elemento de prueba consistió en un tampón relevante en la industria con albúmina sérica humana como ejemplo de un fármaco biofarmacéutico. El elemento de prueba en el presente ejemplo reproduce propiedades clave (pH, conductividad, proteína total) de un producto intermedio de procedimiento en un procedimiento para la producción de un fármaco biofarmacéutico. Un experto en la técnica añadió de antemano BVDV al elemento de prueba añadido de acuerdo con las directrices relevantes.

El reactivo de S/D fue una mezcla de un disolvente y detergentes con efecto de inactivación de virus. En el presente ejemplo se usaron Triton X-100 (TX-100), polisorbato 80 (PS80) y fosfato de tri-n-butilo (TnBP). El reactivo de S/D se diluyó en el mezclador para lograr la concentración objetivo del 0,0473% (p/p) de TX-100, el 0,0144% (p/p) de PS80 y el 0,0131% (p/p) de TnBP durante la incubación de CVI.

Se extrajo una muestra del elemento de prueba añadido antes del comienzo del experimento de CVI para establecer el título de virus inicial. Se tomaron muestras de la corriente en la salida del CVIR a 1, 2, 3, 4 y 5 V_R . Las muestras de la salida se diluyeron inmediatamente 20 veces para detener el procedimiento de inactivación de virus y se valoraron inmediatamente para determinar el título de virus con el fin de establecer el título después del procedimiento de CVI. Se extrajo una muestra del elemento de prueba añadido después de completar el experimento de CVI para que sirviera como control de mantenimiento (HC).

Se midió la inactivación de virus calculando el valor de reducción logarítmica (LRV) como en la ecuación 1 del ejemplo anterior. El factor de dilución sirve para compensar la dilución de la corriente del elemento de prueba añadido con la corriente del reactivo de S/D. El título_{salida} se corrigió para la dilución de detención de la inactivación de virus.

En la figura 29 se representa el perfil del título de BVDV después de 30 y 60 min del procedimiento de incubación de CVI. Una vez que la operación alcanzó el estado estacionario, el BVDV se redujo desde $\geq 7,9E+5$ TCID₅₀/ml en la entrada del CVIR hasta $\leq 2,5E+2$ TCID₅₀/ml en la salida del CVIR independientemente del tiempo de incubación. Antes de alcanzar el estado estacionario, es decir a 1 V_R , el título de BVDV de $\leq 5,0E+2$ TCID₅₀/ml fue mayor que los logrados en la fase de estado estacionario. Esta diferencia puede explicarse por la concentración de los componentes de S/D por debajo de la concentración objetivo a 1 V_R tal como se describió anteriormente.

Una vez en el estado estacionario (desde 2 V_R en adelante) se observó LRV de $\geq 4,5$ para el tiempo de incubación de 30 min y un LRV de $\geq 4,9$ para el tiempo de incubación de 60 min (figura 30). Para la incubación de 30 min, el control de mantenimiento mostró una pérdida de virus por debajo de 1 log₁₀ (el valor de diferencia

mínimo que un experto en la técnica va a considerar significativo y aceptado en las directrices relevantes en la industria). Para la incubación de 60 min, el control de mantenimiento mostró un virus por encima de $1 \log_{10}$, sin embargo esto puede explicarse por la duración del experimento. Mientras que para el experimento de CVI de 30 min, el control de mantenimiento se recuperó aproximadamente 150 min (5×30 min) después de que se preparara el elemento de prueba añadido, para el experimento de CVI de 60 min, el control de mantenimiento se recuperó aproximadamente 300 min (5×30 min) después de que se preparara el elemento de prueba añadido. Por tanto, la pérdida de virus observada en la muestra control de mantenimiento puede explicarse debido a la exposición prolongada a las condiciones físico-químicas (pH, sal, tampón, temperatura, ...) del elemento de prueba añadido. Pese a la pérdida de virus observada en el HC para el experimento de 60 min, está claro que la inactivación de virus se debió al contacto con los componentes de S/D, tal como se observa en 2 V_R , que se produjo antes de 150 min después de la preparación del elemento de prueba añadido (el tiempo transcurrido para la toma de muestras de HC en el experimento de CVI de 30 min).

Un experto en la técnica realizó experimentos discontinuos siguiendo las directrices relevantes en la industria para comparación. Los datos que resultan del procedimiento discontinuo tradicional (mostrado en la figura 31) muestra un LRV de 3,5-3,7 en el tiempo de incubación de 60 min, que es comparable a los obtenidos en el CVIR en el modo de funcionamiento continuo. Esta comparación directa muestra que la inactivación de virus continua usando el CVIR es tan eficaz como el funcionamiento discontinuo tradicional.

Esto indica que la inactivación de virus continua según la invención es altamente ventajosa, porque es tan eficaz como las condiciones de inactivación ideales de inactivación viral en el modo discontinuo (por ejemplo esencialmente igual tiempo de residencia para todas las partes de la mezcla debido a una distribución de tiempo de residencia estrecha, lo que conduce a la inactivación viral eficaz en todas las partes de la mezcla), a la vez que se proporciona la ventaja adicional de que puede llevarse a cabo de manera continua.

Un experto en la técnica entenderá que las condiciones usadas en el ejemplo de inactivación viral no son limitativas del alcance de la invención. Por ejemplo, aunque se usaron perlas no porosas esféricas de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) con diámetros que oscilaban entre 200 y 400 μm con un diámetro medio de 300 μm como ejemplo, según la invención puede usarse cualquier estructura que tenga múltiples canales interconectados, por ejemplo cualquier columna rellena con perlas no porosas. De manera similar, aunque se usó un tubo cilíndrico relleno usando una estación de relleno asistida por vibración a medida como el CVIR que tenía una altura de relleno de 132 mm, un volumen de vacío de $10,66 \pm 0,06$ ml y un volumen de CVIR de $9,40 \pm 0,15$ ml, puede usarse cualquier otro CVIR tal como se define por la presente invención.

Aplicabilidad industrial:

Los métodos, procedimientos y productos de la invención son útiles para la incubación de sustancias en procedimientos de fabricación industrial. Por ejemplo, la invención puede usarse para la producción industrial de productos biofarmacéuticos. Por tanto, la invención puede aplicarse en industria.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Documento WO 2015 158776 A1

(2) Klutz S, Kurt SK, Lobedann M, Kockmann N. Narrow residence time distribution in tubular reactor concept for Reynolds number range of 10-100. Chem Eng Res Des 2015; 95:22-33.

(3) Klutz S, Lobedann M, Bramsiepe C, Schembecker G. Continuous viral inactivation at low pH value in antibody manufacturing. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 2016; 102:88-101.

(4) Documento WO 2015135844 A1

(5) Kateja N, Agarwal H, Saraswat A, Bhat M, Rathore AS. Continuous precipitation of process related impurities from clarified cell culture supernatant using a novel coiled flow inversion reactor (CFIR). Biotechnology Journal 2016.

(6) Documento EP 3 088 006 A1

(7) Wold, S. Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L., PLS-regression: a basic tool of chemometrics. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 2001, 58, 109-130.

(8) Levenspiel, Chemical Reaction Engineering, 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999.