

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 889**

51 Int. Cl.:

B01D 15/18 (2006.01)

B01D 15/36 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

G01N 30/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2012 PCT/EP2012/003866**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050104**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2012 E 12759658 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2763771**

54 Título: **Método y aparato para purificación cromatográfica**

30 Prioridad:

04.10.2011 EP 11008021
29.06.2012 US 201261666338 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2017

73 Titular/es:

MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

SKUDAS, ROMAS

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 601 889 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y aparato para purificación cromatográfica

5 La presente invención se refiere a un método y a un aparato adecuados para un procedimiento de cromatografía continuo que sólo necesita tres columnas de separación. El procedimiento es un procedimiento de dos etapas que comprende dos etapas cromatográficas. La primera etapa cromatográfica (captura) se realiza de manera alternante y secuencial preferiblemente en dos columnas de separación, la segunda etapa cromatográfica (pulido) se realiza, también secuencialmente, en la tercera columna.

Antecedentes de la invención

10 La purificación de proteínas a gran escala, económica, es cada vez más un problema importante para la industria biotecnológica y farmacéutica. Normalmente, las proteínas se producen mediante cultivo celular, usando líneas celulares o bien de mamífero o bien bacterianas modificadas por ingeniería genética para producir la proteína de interés mediante la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen para esa proteína. Puesto que las líneas celulares usadas son organismos vivos, deben alimentarse con un medio de crecimiento complejo, que contiene azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento, suministrado habitualmente a partir de preparaciones de suero animal. La separación de la proteína deseada de la mezcla de compuestos alimentados a las células y de los subproductos de las propias células hasta una pureza suficiente para su uso como agente terapéutico humano plantea un reto formidable.

15 Los procedimientos para la purificación de proteínas de desechos celulares dependen inicialmente del sitio de expresión de la proteína. Algunas proteínas se hace que se secreten directamente de la célula al interior de los medios de crecimiento circundantes; otras se obtienen intracelularmente. Para estas últimas proteínas, la primera etapa de un procedimiento de purificación implica la lisis de la célula, que puede realizarse mediante una variedad de métodos, incluyendo cizalladura mecánica, choque osmótico o tratamientos enzimáticos. Una alteración de este tipo libera todo el contenido de la célula al interior del homogeneizado y, además, produce fragmentos subcelulares que son difíciles de retirar debido a su pequeño tamaño. Estos se retiran generalmente mediante centrifugación o mediante filtración. El mismo problema surge, aunque a menor escala, con las proteínas secretadas directamente debido a la muerte natural de las células y a la liberación de proteínas intracelulares de células huésped en el transcurso de la serie de producción de proteínas.

20 Como consecuencia, los procedimientos de purificación típicos que se usan actualmente incluyen las siguientes etapas:

- 30 - lisis celular para recuperar una proteína intracelular o para la recuperación de una proteína de los medios en el caso de una proteína secretada
- retirada de desechos celulares usando, por ejemplo, filtración o centrifugación diferencial para obtener una muestra clarificada que contiene la proteína de interés
- 35 - uso de una variedad de medios de cromatografía en un procedimiento de múltiples etapas para separar la proteína de interés de otras proteínas y las otras impurezas diversas en la muestra.

40 Las técnicas cromatográficas normalmente separan mezclas de proteínas basándose en su cambio, grado de hidrofobicidad o tamaño. Se dispone de varias resinas de cromatografía diferentes para cada una de estas técnicas, permitiendo la adaptación precisa del esquema de purificación a la proteína particular implicada. La esencia de cada uno de estos métodos de separación es que pueden producirse proteínas que o bien se descienden a diferentes velocidades a lo largo de una columna, logrando una separación física que aumenta a medida que bajan adicionalmente por la columna, o bien se adhieren selectivamente al medio de separación, eluyéndose entonces de manera diferencial mediante disolventes diferentes. En algunos casos, la proteína deseada se separa de las impurezas cuando las impurezas se adhieren específicamente a la columna y la proteína de interés no, es decir, la proteína de interés está presente en la "fracción de flujo continuo".

45 La cromatografía de intercambio iónico, denominada así por el contraión intercambiable, es un procedimiento aplicable para la purificación de moléculas ionizables. Las moléculas ionizadas se separan basándose en la interacción electrostática no específica de sus grupos cargados con moléculas con carga opuesta unidas a la matriz de soporte de fase sólida, retardando de ese modo aquellas moléculas ionizadas que interaccionan más fuertemente con la fase sólida. La carga neta de cada tipo de molécula ionizada, y su afinidad por la matriz, varía según el número de grupos cargados, la carga de cada grupo y la naturaleza de las moléculas que compiten por la interacción con la matriz de fase sólida cargada. Estas diferencias dan como resultado la resolución de diversos tipos de molécula mediante cromatografía de intercambio iónico. En la purificación de proteínas típica usando cromatografía de intercambio iónico, se aplica una mezcla de muchas proteínas derivadas de una célula huésped,

tal como en cultivo de células de mamífero, a una columna de intercambio iónico. Una vez eliminadas las moléculas que no se unen, se ajustan las condiciones, tal como cambiando el pH, la concentración del contraíón y similares en un modo por etapas o en gradiente, para liberar de la fase sólida una proteína ionizada no retenida específicamente o retardada de interés y para separarla de proteínas que tienen diferentes características de carga. La cromatografía de intercambio aniónico implica la competición de una molécula aniónica de interés con el contraíón negativo para su interacción con una molécula cargada positivamente unida a la matriz de fase sólida al pH y en las condiciones de un procedimiento de separación particular. En cambio, la cromatografía de intercambio catiónico implica la competición de una molécula catiónica de interés con el contraíón positivo para una molécula cargada negativamente unida a la matriz de fase sólida al pH y en las condiciones de un procedimiento de separación particular. La cromatografía de intercambio iónico en modo mixto implica el uso de una combinación de medios cromatográficos de intercambio catiónico o aniónico en la misma etapa. En particular, "modo mixto" se refiere a una matriz de soporte de fase sólida a la que se une covalentemente una mezcla de restos de interacción hidrófobos y de intercambio catiónico y/o intercambio aniónico.

La cromatografía de afinidad, que se aprovecha de una interacción específica estructuralmente dependiente (es decir, espacialmente complementaria) entre la proteína que va a purificarse y un agente de captura inmovilizado, es una opción de purificación convencional para algunas proteínas, tales como anticuerpos. La proteína A, por ejemplo, es un adsorbente útil para la cromatografía de afinidad de proteínas, tales como anticuerpos, que contienen una región Fc. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad (aproximadamente 10^{-8} M a la IgG humana) a la región Fc de anticuerpos. Pese a su uso común, la cromatografía de afinidad es costosa, particularmente a la escala industrial necesaria para purificar proteínas terapéuticas.

Métodos cromatográficos adicionales son la cromatografía con hidroxapatita o la cromatografía de interacción hidrófoba (CIH).

Por consiguiente, los procedimientos de purificación típicos incluyen diferentes etapas de centrifugación y filtración, así como al menos 3 técnicas de separación cromatográfica tales como cromatografía de afinidad (CA), cromatografía de permeación en gel (CPG), cromatografía de intercambio iónico (CII), cromatografía de interacción hidrófoba (CIH), cromatografía de fase inversa (CFI) y cromatografía de fase normal (CFN). Habitualmente, cada una de las técnicas nombradas requiere condiciones de funcionamiento diferentes (tampón, pH, conductividad) que conducen a la preparación de la muestra antes de la implementación de la separación cromatográfica. Podría lograrse un procedimiento de purificación más eficaz y económico eliminando las etapas de plegamiento/preparación de la muestra entremedias de las etapas de purificación mediante la combinación directa de diversos modos cromatográficos en un tren de purificación.

La técnica de cromatografía discontinua simple está bien aceptada en las aplicaciones industriales, sin embargo, esta tecnología es cara debido a los tiempos largos de procesamiento y altos costes de funcionamiento (por ejemplo, grandes cantidades de disolvente, resinas y hardware caros). Esta técnica también es sensible a las condiciones de funcionamiento (por ejemplo, título del producto, tiempo de residencia y velocidad de alimentación (comenzando las pérdidas de producto a partir de valores de capacidad de unión dinámica del 80%).

También se desarrollaron algunas tecnologías semicontinuas alternativas, lo que significa que conectan dos o tres modos de cromatografía diferentes, pero no permiten que uno tenga una alimentación continua.

El documento WO 2011/037522 da a conocer un sistema de separación que comprende al menos dos unidades de separación que están conectadas salida con entrada. Todas las columnas están conectadas en línea.

El documento WO 2011/017514 da a conocer la combinación de una etapa de cromatografía de afinidad y dos etapas de cromatografía de intercambio iónico sin necesidad de mantener tanques ni etapas de intercambio de tampón.

El documento WO 2009/045897 da a conocer sistemas y métodos para purificar proteínas para lo que varias columnas de cromatografía diferentes están en serie con etapas intermedias.

Isabelle Francois *et al.*, Journal of Chromatography A, 1178 (2008), 33-42 dan a conocer un método de cromatografía bidimensional con dos columnas paralelas en la segunda dimensión.

Sin embargo, todavía existe la necesidad de una solución más eficaz y económica.

Breve descripción de la invención

Sorprendentemente, se ha encontrado un sistema que no sólo permite la conexión de unidades de separación (columnas) sino que también permite una alimentación continua. Esto se logra proporcionando al menos dos

columnas de captura.

La presente invención se refiere, por tanto, a un aparato que comprende

- 5 - dos unidades de separación A1 y A2 que tienen ambas la misma matriz de cromatografía y una unidad de separación B que tiene una matriz de cromatografía que difiere de la matriz de cromatografía de las unidades de separación A1 y A2, teniendo todas las unidades de separación una entrada de fluido y una salida de fluido, para lo que hay al menos conexión de fluido entre la salida de fluido de la unidad de separación A1 y la entrada de fluido de la unidad de separación B y conexión de fluido entre la salida de fluido de la unidad de separación A2 y la entrada de fluido de la unidad de separación B (línea de conexión C-P en las figuras 2, 3 y 4)
- 10 - al menos una válvula en la conexión de fluido entre las columnas de separación A1 y A2 y la columna de separación B que permite cambiar entre comunicación de fluido entre la salida de fluido de la columna de separación A1 y la entrada de fluido de la columna de separación B y comunicación de fluido entre la salida de fluido de la columna de separación A2 y la entrada de fluido de la columna de separación B.
- 15 - al menos dos depósitos de tampón y al menos dos bombas para lo que los depósitos de tampón están al menos en conexión de fluido con las entradas de las unidades de separación A1 y A2 y las bombas se usan para transportar el líquido desde los depósitos hacia las unidades de separación
- un depósito que contiene disolución de muestra (alimentación de muestra), que está en conexión de fluido con la entrada de las unidades de separación A1 y A2
- 20 En una realización, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de afinidad, una de intercambio catiónico, una de cromatografía de intercambio aniónico o una matriz de intercambio catiónico en modo mixto.
- En otra realización, la unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía de intercambio catiónico, una de intercambio aniónico en modo mixto o una de intercambio aniónico.
- 25 En otra realización, la unidad de separación B tiene una mezcla de matrices que incluyen una matriz de cromatografía de intercambio catiónico y una de intercambio aniónico o una matriz de intercambio aniónico en modo mixto o una matriz de intercambio catiónico en modo mixto y una matriz de intercambio aniónico.
- En una realización preferida, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de afinidad y la unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía de intercambio catiónico.
- 30 En otra realización preferida, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de afinidad y la unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía de intercambio aniónico o una de intercambio aniónico en modo mixto.
- En otra realización, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de afinidad y la unidad de separación B tiene una mezcla de una matriz de cromatografía de intercambio aniónico y una de intercambio catiónico.
- 35 En otra realización, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de afinidad y la unidad de separación B tiene una mezcla de una matriz de cromatografía de intercambio aniónico y una de intercambio catiónico en modo mixto o una mezcla de una matriz de cromatografía de intercambio aniónico y una de intercambio catiónico en modo mixto o una mezcla de una matriz de cromatografía de intercambio catiónico en modo mixto y una de intercambio aniónico en modo mixto.
- 40 En otra realización preferida, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de intercambio catiónico o una de intercambio catiónico en modo mixto y la unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía de intercambio aniónico o una de intercambio aniónico en modo mixto.
- En otra realización, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de intercambio aniónico o una de intercambio aniónico en modo mixto y la unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía de intercambio catiónico o una de intercambio catiónico en modo mixto.
- 45 En otra realización preferida, dos unidades de separación A1 y A2 tienen ambas al menos una válvula de selección de fluido en la salida de la unidad de separación, para lo que al menos un canal de las válvulas de selección de fluido en las salidas de las unidades de separación A1 y A2 está conectado con la entrada de la unidad de separación B (a través de una línea de conexión), que permite el control (inicio y detención) de una comunicación de

fluido entre la unidad de separación A1 y la unidad de separación B y entre la unidad de separación A2 y la unidad de separación B.

En otra realización preferida, la unidad de separación B tiene una válvula de selección de fluido en la salida de la unidad de separación.

- 5 En otra realización preferida, las unidades de separación A1 y A2 tienen ambas al menos una válvula de selección de fluido en la entrada de la unidad de separación.

En una realización preferida, el aparato comprende además una línea de conexión entre la salida de fluido de la unidad de separación A1 y la entrada de fluido de la unidad de separación A2 y una línea de conexión entre la salida de fluido de la unidad de separación A2 y la entrada de fluido de la unidad de separación A1 (líneas de conexión F-F en las figuras 2, 3 y 4), permitiendo, por tanto, una comunicación de fluido entre la salida de la unidad de separación A1 y la entrada de la unidad de separación A2 así como una comunicación de fluido entre la salida de la unidad de separación A2 y la entrada de la unidad de separación A1. En una realización muy preferida, al menos una válvula está ubicada en la línea de conexión entre la salida de la unidad de separación A1 y la entrada de la unidad de separación A2 y al menos una válvula está ubicada en la línea de conexión entre la salida de la unidad de separación A2 y la entrada de la unidad de separación A1. Normalmente, las válvulas están ubicadas cerca de las salidas de las unidades de separación A1 y A2 y/o cerca de las entradas de las unidades de separación A1 y A2.

En otra realización preferida, el aparato comprende dos líneas de conexión entre la salida de fluido de la unidad de separación A1 y la entrada de fluido de la unidad de separación A2 y dos líneas de conexión entre la salida de fluido de la unidad de separación A2 y la entrada de fluido de la unidad de separación A1 (líneas de conexión F-F y W-F en la figura 4), permitiendo, por tanto, una comunicación de fluido entre la salida de la unidad de separación A1 y la entrada de la unidad de separación A2, así como una comunicación de fluido entre la salida de la unidad de separación A2 y la entrada de la unidad de separación A1. En una realización muy preferida, las válvulas están ubicadas cerca de la entrada y la salida de las unidades de separación A1 y A2 y las líneas de conexión parten de estas válvulas.

- 25 En otra realización preferida, al menos dos depósitos de tampón están en conexión de fluido con las entradas de las unidades de separación A1 y A2. Una o más válvulas y/o entradas de fluido adicionales podrían estar ubicadas en la línea de conexión entre los depósitos de tampón y las entradas de las unidades de separación A1 y A2.

En otra realización preferida, el aparato comprende además una o más entradas de fluido adicionales antes de las entradas de fluido de las unidades de separación A2 y A1, preferiblemente de una línea de conexión entre la salida de fluido de la unidad de separación A2 y la entrada de fluido de la unidad de separación A1 y de una línea de conexión entre la salida de fluido de la unidad de separación A1 y la entrada de fluido de la unidad de separación A2.

En otra realización preferida, el aparato comprende una entrada de fluido adicional antes de la entrada de fluido de la columna B lo que significa que preferiblemente una línea de conexión con uno o más depósitos está ubicada antes de la entrada de fluido de la columna B en la línea de conexión entre las salidas de columnas A1 y A2 y la entrada de columna B.

En otra realización preferida, el aparato comprende un depósito adicional con tampón de inactivación de virus que está al menos en conexión de fluido con la entrada de una de las tres unidades de separación.

La presente invención se refiere además a un método continuo de purificación de una molécula objetivo de una o más impurezas en una muestra, comprendiendo el método las etapas de

- cargar alternativamente la muestra en las unidades de separación A1 y A2 de modo que mientras que la muestra se carga en la unidad de separación A1, en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación A1, la unidad de separación A2 está al menos en parte en comunicación de fluido con la unidad de separación B de modo que la molécula objetivo cargada en la unidad de separación A2 se eluye sobre la unidad de separación B y la unidad de separación A2 se reequilibra, y mientras que la muestra se carga en la unidad de separación A2 en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación A2, la unidad de separación A1 está al menos en parte en comunicación de fluido con la unidad de separación B de modo que la molécula objetivo se eluye sobre la unidad de separación B y la unidad de separación A1 se reequilibra

- 50 - recuperar la molécula objetivo de la salida de fluido de la unidad de separación B.

En una realización preferida, la molécula objetivo es un anticuerpo.

En una realización preferida, la muestra se carga de manera continua alternativamente a o bien la unidad de separación A1 o bien la unidad de separación A2.

En otra realización, las unidades de separación A1 y A2 están dispuestas en el modo de unión y elusión y la unidad de separación B está dispuesta en el modo de flujo continuo.

5 En otra realización preferida, mientras se carga la muestra sobre la unidad de separación A1, la salida de fluido de la unidad de separación A1 está al menos en parte en comunicación de fluido con la entrada de fluido de la unidad de separación A2 para permitir la captura de la molécula objetivo que empieza a lixiviarse de la unidad de separación A1 para que se una a la unidad de separación A2. Y mientras se carga la muestra sobre la unidad de separación A2, la salida de fluido de la unidad de separación A2 está preferiblemente al menos en parte en comunicación de fluido
10 con la entrada de fluido de la unidad de separación A1 para permitir la captura de la molécula objetivo que empieza a lixiviarse de la unidad de separación A2 para que se una a la unidad de separación A1.

En otra realización preferida, mientras se lava la muestra no unida de la unidad de separación A1, la unidad de separación A2 está al menos en parte en comunicación de fluido con el depósito que contiene disolución de muestra y con la unidad de separación A1. Esto significa que la unidad de separación A2 se carga simultáneamente con muestra no unida que se eluye de la unidad A1 y con disolución de muestra que procede del depósito. Y mientras se lava la muestra no unida de la unidad de separación A2, la unidad de separación A1 está en comunicación de fluido
15 con el depósito que contiene disolución de muestra y con la unidad de separación A2.

En otra realización preferida, mientras la unidad de separación B está en comunicación de fluido con la unidad de separación A1, también está en comunicación de fluido con un depósito de tampón. Y mientras la unidad de separación B está en comunicación de fluido con la unidad de separación A2, también está en comunicación de fluido con un depósito de tampón.
20

En una realización preferida, se bombea un tampón de inactivación de virus a través de las unidades de separación A1 y A2 tras cargar las unidades con la molécula objetivo.

En otra realización, si la unidad de separación B está dispuesta en el modo de unión/elusión, se bombea un tampón de inactivación de virus a través de la unidad de separación B tras cargar la unidad con la molécula objetivo.
25

En una realización preferida, la muestra sometida al método de la presente invención es una muestra clarificada. Esto significa que antes de cargar la muestra en la unidad de separación A1 o A2 se clarifica sometiéndola a uno o más de los siguientes: centrifugación, filtración y/o sedimentación. En una realización muy preferida, la muestra se trata con un agente precipitante antes de la clarificación mediante centrifugación, filtración y/o sedimentación.

30 Figuras

La figura 1 muestra una vista esquemática de una realización preferida del aparato según la presente invención. Muestra las dos unidades de separación por captura (CIEX), una unidad de separación por pulido (AIEX), los depósitos (CIP, VI, E.A, E.B, Dil., alimentación, CIP, E.A, E. B) así como las líneas de conexión, válvulas, bombas y detectores.

35 Las figuras 2, 3 y 4 muestran esquemáticamente diferentes realizaciones del aparato según la invención. La figura 2 muestra una configuración que se limita principalmente a las características esenciales pero, por ejemplo, tiene una entrada de fluido adicional antes de unidad de separación B (entrada C). La figura 3 muestra una configuración que comprende adicionalmente conexión de fluido entre la salida de la unidad de separación A1 y la entrada de la unidad de separación A2 así como conexión de fluido entre la salida de la unidad de separación A2 y la entrada de la
40 unidad de separación A2 (línea de conexión F-F). La figura 4 muestra una configuración con dos líneas de conexión que permiten la conexión de fluido entre la salida de la unidad de separación A1 y la entrada de la unidad de separación A2 así como dos líneas de conexión que permiten la conexión de fluido entre la salida de la unidad de separación A2 y la entrada de la unidad de separación A2 (línea de conexión F-F, línea de conexión W-F).

La figura 5 muestra una realización del aparato según la invención con tres unidades de separación por captura A1, A2 y A3 y dos unidades de separación por pulido B1 y B2.
45

Definiciones

Antes de describir la presente invención en detalle, ha de entenderse que esta invención no se limita a composiciones o etapas de procedimiento específicas, ya que estas pueden variar. Debe observarse que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un ligando" incluye una pluralidad de ligandos y la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de anticuerpos y
50

similares.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica al que se refiere esta invención. Los siguientes términos se definen para los fines de la invención tal como se describe en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento el término "molécula objetivo" se refiere a cualquier molécula, sustancia o compuesto o mezclas de los mismos que deben aislarse, separarse o purificarse de una o más impurezas en una muestra. En una realización preferida, la molécula objetivo es una proteína o una mezcla de dos o más proteínas. En una realización muy preferida, la molécula objetivo es un anticuerpo.

El término "anticuerpo" se refiere a una proteína que tiene la capacidad para unirse específicamente a un antígeno. Normalmente, los anticuerpos tienen una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas que consisten en dos cadenas pesadas y dos ligeras, estabilizándose dichas cadenas, por ejemplo, mediante enlaces de sulfuro entre cadenas. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, anticuerpos IgM que existen en forma pentamérica y/o anticuerpos IgA que existen en forma monomérica, dimérica o multimérica. Los anticuerpos también pueden incluir anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre que conserven, o se modifiquen para comprender, un dominio de unión específico de ligando. El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos residuos de aminoácido que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos pueden obtenerse a través de tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos también pueden obtenerse mediante medios recombinantes. Cuando se producen de manera recombinante, los fragmentos pueden expresarse solos o como parte de una proteína más grande denominada proteína de fusión. Los fragmentos a modo de ejemplo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fc y/o Fv. Las proteínas de fusión a modo de ejemplo incluyen proteínas de fusión de Fc. Según la presente invención, las proteínas de fusión están englobadas por el término "anticuerpo".

Tal como se comentó anteriormente, en algunas realizaciones, un anticuerpo es una proteína que contiene una región Fc, por ejemplo, una inmunoglobulina. En algunas realizaciones, una proteína que contiene una región Fc es una proteína recombinante que incluye la región Fc de una inmunoglobulina fusionada a otro polipéptido o a un fragmento del mismo. Los polipéptidos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, renina; una hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; α -1-antitripsina; cadena α de insulina; cadena β de insulina; proinsulina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrands; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como urocinasa o activador de plasminógeno humano de tipo tisular o de orina (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral α y β ; encefalinasa; RANTES (quimiocina regulada por activación, expresada y secretada normalmente por células T); proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1- α); una albúmina sérica tal como albúmina sérica humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena α de relaxina; cadena β de relaxina; pro-relaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como β -lactamasa; ADNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocito T citotóxico (CTLA) (por ejemplo, CTLA-4); inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado de huesos (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como α FGF y β FGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF- α y TGF- β , incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I y IGF-II); des(I-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteínas de unión a factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP); proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD 19, CD20, CD34 y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón- α , β y γ ; factor estimulante de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de la superficie de membranas; factor acelerador de la degradación; antígeno viral tal como, por ejemplo, una parte de la envuelta del virus del sida; proteínas transportadoras; receptores de migración; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CDI Ia, CDI Ib, CDI Ic, CD 18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente. Además, un anticuerpo según la presente invención es cualquier proteína o polipéptido, fragmento o variante del mismo, que se une específicamente a cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, y a menos que se indique otra cosa, el término "muestra" se refiere a cualquier composición o mezcla que contiene una molécula objetivo. Las muestras pueden derivarse de fuentes biológicas o de otras. Las fuentes biológicas incluyen fuentes eucariotas y procariotas, tales como células, tejidos y

5 órganos de plantas y animales. La muestra también puede incluir diluyentes, tampones, detergentes y especies contaminantes, desechos y similares que se encuentran mezclados con la molécula objetivo. La muestra puede estar “parcialmente purificada” (es decir, haberse sometido a una o más etapas de purificación, tales como etapas de filtración) o puede obtenerse directamente de una célula u organismo huésped que produce la molécula objetivo (por ejemplo, la muestra puede comprender fluido recogido de cultivo celular).

10 El término “impureza” o “contaminante” tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula extraña u objetable, incluyendo una macromolécula biológica tal como ADN, ARN, una o más proteínas de células huésped, endotoxinas, lípidos y uno o más aditivos que pueden estar presentes en una muestra que contiene una molécula objetivo que está separándose de una o más de las moléculas extrañas u objetables usando un procedimiento de la presente invención. Adicionalmente, una impureza de este tipo puede incluir cualquier reactivo que se use en una etapa que puede producirse antes del método de la invención.

15 Los términos “purificar”, “separar” o “aislar”, tal como se usan de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a aumentar el grado de pureza de una molécula objetivo de una composición o muestra que comprende la molécula objetivo y una o más impurezas. Normalmente, el grado de pureza de la molécula objetivo aumenta retirando (completa o parcialmente) al menos una impureza de la composición.

20 Los términos “procedimiento de flujo continuo” “modo de flujo continuo” y “cromatografía de flujo continuo”, tal como se usan de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a una técnica de separación de productos en la que se desea que al menos un producto (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc) contenido en una muestra junto con uno o más contaminantes fluya de manera continua a través de una resina o medio cromatográfico, mientras que al menos un contaminante o impureza potencial se une a la resina o medio cromatográfico. El “modo de flujo continuo” es generalmente una operación isocrática (es decir, un procedimiento de cromatografía durante el cual no cambia la composición de la fase móvil).

25 En algunas realizaciones según los métodos reivindicados y tal como se describe en los ejemplos expuestos en el presente documento, los métodos, por ejemplo, emplean una etapa de cromatografía de intercambio aniónico y/o catiónico que se realiza en un modo de flujo continuo.

Los términos “modo de unión y elución” y “procedimiento de unión y elución”, tal como se usan de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a una técnica de separación de productos en la que al menos un producto (molécula objetivo) contenido en una muestra (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc) se une a una resina o medio cromatográfico y posteriormente se eluye.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “depósito” tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier recipiente, tanque o bolsa, que puede usarse para almacenar cualquier tampón que va a usarse cuando se realiza el método de la invención o la muestra o cualquier otro líquido que se use en el método de la invención. Adicionalmente un “depósito” es un recipiente, tanque o bolsa que se usa para recoger la salida de una etapa de procedimiento (por ejemplo, un eluato de una columna).

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “dilución en línea” se refiere a una etapa de intercambio de tampón o a un ajuste del estado de disolución en línea, que normalmente es una alternativa en muchos procedimientos convencionales al uso de un tanque de contención. En una dilución en línea típica, pueden mezclarse o titularse dos disoluciones durante la transferencia usando una combinación de disoluciones en una tubería o recipiente de mezclado, dispositivo o aparato de filtración. Por ejemplo, puede requerirse diluir una disolución con el fin de reducir la conductividad combinando la disolución con otra disolución de conductividad menor. El intercambio de tampón puede llevarse a cabo con la ayuda de dispositivos de filtración, tales como diafiltración, ultrafiltración y similares. En algunas realizaciones según la invención reivindicada, los métodos proporcionan un procedimiento mejorado para purificar proteínas, que elimina la necesidad de una etapa de intercambio de tampón.

45 El término “cromatografía” se refiere a cualquier tipo de técnica que separa un analito de interés (por ejemplo, una molécula objetivo) de otras moléculas presentes en una mezcla. Habitualmente, la molécula objetivo se separa de otras moléculas como resultado de diferencias en las velocidades a las que migran las moléculas individuales de la mezcla a través de un medio estacionario bajo la influencia de una fase móvil, o en procedimientos de unión y elución.

50 Los términos “matriz” o “matriz de cromatografía” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a cualquier tipo de sorbente, resina o fase sólida que en un procedimiento de separación separa una molécula objetivo (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc tal como un inmunoglobulina) de otras moléculas presentes en una mezcla. Habitualmente, la molécula objetivo se separa de otras moléculas como resultado de diferencias en las velocidades a las que migran las moléculas individuales de la mezcla a través de la matriz bajo la influencia de una fase móvil, o en procedimientos de unión y elución. Los ejemplos no limitativos

incluyen resinas particuladas, monolíticas o fibrosas así como membranas que pueden colocarse en columnas o cartuchos. Los ejemplos de materiales para formar la matriz incluyen polisacáridos (tales como agarosa y celulosa); y otras matrices mecánicamente estables tales como sílice (por ejemplo, vidrio de poro controlado), poli(estirendivinil) benceno, poliacrilamida, partículas de cerámica y derivados de cualquiera de los anteriores.

5 Ejemplos para tipos de matriz típicos adecuados para el método de la presente invención son resinas de intercambio catiónico, resinas de afinidad, resinas de intercambio aniónico o resinas en modo mixto.

Un "ligando" es un grupo funcional que se une a la matriz de cromatografía y que determina las propiedades de unión de la matriz. Los ejemplos de "ligandos" incluyen, pero no se limitan a, grupos de intercambio iónico, grupos de interacción hidrófoba, grupos de interacción hidrófila, grupos de interacciones tiófilas, grupos de afinidad con metal, grupos de afinidad, grupos de bioafinidad y grupos en modo mixto (combinaciones de los mencionados anteriormente). Algunos ligandos preferidos que pueden usarse en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, grupos de intercambio catiónico fuerte, tales como sulfopropilo, ácido sulfónico; grupos de intercambio aniónico fuerte, tales como cloruro de trimetilamonio; grupos de intercambio catiónico débil, tales como ácido carboxílico; grupos de intercambio aniónico débil, tales como N₅N dietilamino o DEAE; grupos de interacción hidrófoba, tales como fenilo, butilo, propilo, hexilo; y grupos de afinidad, tales como proteína A, proteína G y proteína L.

El término "cromatografía de afinidad" se refiere a una técnica de separación de proteínas en la que una proteína objetivo (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc de interés o anticuerpo) se une específicamente a un ligando que es específico para la proteína objetivo. Un ligando de este tipo generalmente se denomina un ligando bioespecífico. En algunas realizaciones, el ligando bioespecífico (por ejemplo, proteína A o una variante funcional de la misma) se une covalentemente a un material de matriz de cromatografía y es accesible para la proteína objetivo en disolución cuando la disolución entra en contacto con la matriz de cromatografía. La proteína objetivo generalmente conserva su afinidad de unión específica para el ligando bioespecífico durante las etapas cromatográficas, mientras que otros solutos y/o proteínas en la mezcla no se unen de manera apreciable o específica al ligando. La unión de la proteína objetivo al ligando inmovilizado permite que las proteínas contaminantes o impurezas proteicas se hagan pasar a través de la matriz de cromatografía mientras que la proteína objetivo permanece unida específicamente al ligando inmovilizado en la fase sólida material. Entonces se retira la proteína objetivo unida específicamente en forma activa del ligando inmovilizado en condiciones adecuadas (por ejemplo, pH bajo, pH alto, alta concentración de sal, ligando de competición, etc.), y se hace pasar a través de la columna cromatográfica con el tampón de elución, libre de las proteínas contaminantes o impurezas proteicas que se habían permitido pasar anteriormente a través de la columna. Puede usarse cualquier componente como ligando para purificar sus proteínas de unión específicas respectivas, por ejemplo, un anticuerpo. Sin embargo, en diversos métodos según la presente invención, se usa proteína A como ligando para una proteína objetivo que contiene una región Fc. Las condiciones para la elución del ligando bioespecífico (por ejemplo, proteína A) de la proteína objetivo (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc) pueden determinarse fácilmente por un experto habitual en la técnica. En algunas realizaciones, puede usarse proteína G o proteína L o una variante funcional de la misma como ligando bioespecífico. En algunas realizaciones, se usa un ligando bioespecífico tal como proteína A a un intervalo de pH de 5-9 para unirse a una proteína que contiene una región Fc, lavando o re-equilibrando el conjugado de ligando bioespecífico / proteína objetivo, seguido por elución con un tampón que tiene un pH de aproximadamente o inferior a 4 que contiene al menos una sal.

El término "intercambio iónico" y "cromatografía de intercambio iónico" se refiere al procedimiento cromatográfico en el que un soluto o analito de interés (por ejemplo, una proteína objetivo que contiene una región Fc) en una mezcla interacciona con un compuesto cargado unido (tal como mediante unión covalente) a un material de intercambio iónico de fase sólida de manera que el soluto o analito de interés interacciona de manera no específica con el compuesto cargado más o menos que las impurezas o contaminantes del soluto en la mezcla. Los solutos contaminantes en la mezcla eluyen de una columna del material de intercambio iónico más rápido o más lento que el soluto de interés o se unen a o se excluyen de la resina en relación con el soluto de interés. "Cromatografía de intercambio iónico" incluye específicamente cromatografía de intercambio catiónico, de intercambio aniónico y de intercambio iónico en modo mixto. Por ejemplo, la cromatografía de intercambio catiónico puede unir la molécula objetivo (por ejemplo, una proteína objetivo que contiene una región Fc) seguido por elución (cromatografía de intercambio catiónico de unión y elución o "CIEX") o puede unir predominantemente las impurezas mientras que la molécula objetivo "fluye de manera continua a través de" la columna (cromatografía de intercambio catiónico de flujo continuo FT-CIEX). La cromatografía de intercambio aniónico puede unir la molécula objetivo (por ejemplo, una proteína objetivo que contiene una región Fc) seguido por elución o puede unir predominantemente las impurezas mientras que la molécula objetivo "fluye de manera continua a través de" la columna. En algunas realizaciones y tal como se demuestra en los ejemplos expuestos en el presente documento, la etapa de cromatografía de intercambio aniónico se realiza en un modo de flujo continuo.

La expresión "matriz de intercambio iónico" se refiere a una matriz de cromatografía que está cargada negativamente (es decir, una resina de intercambio catiónico) o cargada positivamente (es decir, una resina de intercambio aniónico). La carga puede proporcionarse uniendo uno o más ligando cargados a la matriz, por ejemplo, mediante unión covalente. Alternativamente, o además, la carga puede ser una propiedad inherente de la matriz (por

ejemplo, como es el caso para la sílice, que tiene una carga negativa global).

Una “matriz de intercambio catiónico” se refiere a una matriz de cromatografía que está cargada negativamente y que, por tanto, tiene cationes libres para el intercambio con cationes en una disolución acuosa que se hace pasar sobre o a través de la fase sólida. Un ligando cargado negativamente unido a la fase sólida para formar la resina de intercambio catiónico puede ser, por ejemplo, un carboxilato o sulfonato. Las resinas de intercambio catiónico disponibles comercialmente incluyen carboximetilcelulosa, sulfopropilo (SP) inmovilizado en agarosa (por ejemplo, SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ o SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™ de Pharmacia) y sulfonilo inmovilizado en agarosa (por ejemplo, S-SEPHAROSE FAST FLOW™ de Pharmacia). Se prefiere Fractogel® EMD SO3, Fractogel® EMD SE Highcap, Eshmuno® S y Fractogel® EMD COO (Merck).

Una matriz en “modo mixto” es una matriz de cromatografía que porta al menos dos tipos de funcionalidades que pueden interactuar con la molécula objetivo y/o las impurezas. Tales funcionalidades pueden ser grupos de intercambio iónico, grupos de interacción hidrófoba, grupos de interacción hidrófila, grupos de interacciones tiófilas, grupos de afinidad con metal, grupos de afinidad y grupos de bioafinidad. Matrices en modo mixto preferidas que van a usarse en la presente invención son matrices que portan al menos grupos de intercambio aniónico y de intercambio catiónico o matrices de intercambio iónico en modo mixto. “Portar al menos dos tipos de funcionalidades” significa en una realización que se proporciona un tipo de matriz que está modificada covalentemente con al menos dos tipos de funcionalidades diferentes. También es posible que la matriz en modo mixto esté compuesta por una combinación de dos o más matrices diferentes que tiene cada una al menos una funcionalidad, para lo que la combinación se realiza combinando las matrices en una unidad de separación. En este caso, la matriz en modo mixto puede ser una mezcla de dos matrices diferentes, portando cada matriz al menos una funcionalidad, por ejemplo, puede ser una mezcla de una matriz de intercambio catiónico y una matriz de intercambio aniónico, ambas presentes, por ejemplo, en forma de partículas sorbentes que pueden mezclarse fácilmente en la unidad de separación. También es posible acoplar una columna rellena con una primera matriz con otra columna rellena con una segunda matriz a una unidad de separación de modo que el líquido de muestra esté fluyendo a través de ambas matrices.

Una “matriz de intercambio iónico en modo mixto” se refiere a una matriz de cromatografía que está modificada covalentemente con restos catiónicos y/o aniónicos e hidrófobos. Una resina de intercambio iónico en modo mixto disponible comercialmente es BAKERBOND ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) que contiene grupos de intercambio catiónico débil, una baja concentración de grupos de intercambio aniónico y ligandos hidrófobos unidos a una matriz de soporte de fase sólida de gel de sílice. Las matrices de intercambio catiónico en modo mixto normalmente tienen grupos de intercambio catiónico y matrices hidrófobas. Matrices de intercambio catiónico en modo mixto adecuadas son Captio® MMC (GE Healthcare) y Eshmuno® HCX (Merck).

Matrices de intercambio aniónico en modo mixto normalmente tienen grupos de intercambio aniónico y restos hidrófobos. Matrices de intercambio aniónico en modo mixto adecuadas son Captio® Adhere (GE Healthcare).

El término “matriz de intercambio aniónico” se usa en el presente documento para referirse a una matriz de cromatografía que está cargada positivamente, por ejemplo, que tiene uno o más ligandos cargados positivamente, tales como amino grupos cuaternarios, unidos a la misma. Las resinas de intercambio aniónico disponibles comercialmente incluyen DEAE celulosa, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ (Pharmacia). Materiales preferidos son Fractogel® EMD TMAE, Fractogel® EMD TMAE highcap, Eshmuno® Q y Fractogel® EMD DEAE.

Los términos “proteína A” y “Prot A” se usan de manera intercambiable en el presente documento y engloban proteína A recubierta de una fuente nativa de la misma, proteína A producida de manera sintética (por ejemplo, mediante síntesis de péptidos o mediante técnicas recombinantes) y variantes de la misma que conservan la capacidad para unirse a proteínas que tienen una región CH₂/CH₃, tal como una región Fc. La proteína A puede adquirirse comercialmente de Repligen, Pharmacia y Fermatech. La proteína A se inmoviliza generalmente en una matriz de cromatografía. El término “ProA” también se refiere a una matriz o columna de cromatografía de afinidad que contiene una matriz de soporte sólida cromatográfica a la que se une covalentemente la proteína A.

Un derivado, fragmento o variante funcional de la proteína A usado en los métodos según la presente invención puede caracterizarse por una constante de unión de al menos $K=10^{-8}$ M, y preferiblemente $K=10^{-9}$ M, para la región Fc de IgG2a de ratón o IgG1 humana. Una interacción que se amolda a tal valor para la constante de unión se denomina “unión de alta afinidad” en el presente contexto. Preferiblemente, un derivado o variante funcional de proteína A de este tipo comprende al menos parte de un dominio de unión a IgG funcional de proteína A de tipo natural, seleccionado de los dominios naturales E, D, A, B, C o mutantes obtenidos por ingeniería genética de los mismos que tienen funcionalidad de unión a IgG conservada.

Además, también pueden usarse derivados o variantes de proteína A obtenidos por ingeniería genética que permiten una unión en un único punto en la etapa de cromatografía de afinidad en los métodos reivindicados.

Unión en un único punto generalmente significa que el resto de proteína se une a través de una única unión covalente a un material de soporte cromatográfico de la cromatografía de afinidad con proteína A. Una unión en un único punto de este tipo también puede producirse mediante el uso de residuos reactivos adecuados que está colocados en una posición de aminoácido expuesto, concretamente en un bucle, cerca del extremo N o C-terminal o en otro sitio en la circunferencia externa del plegamiento de proteína. Tales grupos reactivos son por ejemplo funciones sulfhidrilo o amino.

El término “matriz de cromatografía de afinidad” se usa en el presente documento para referirse a una matriz de cromatografía que porta ligandos adecuados para cromatografía de afinidad. Normalmente, los ligandos (por ejemplo, proteína A o una variante funcional de la misma) se unen covalentemente a un material de matriz de cromatografía y son accesibles a la molécula objetivo en disolución cuando la disolución entra en contacto con la matriz de cromatografía. Un ejemplo de una matriz de cromatografía de afinidad es una matriz de proteína A.

El término “unión” tal como se usa en el presente documento para describir interacciones entre una molécula objetivo (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc) y un ligando unido a una matriz (por ejemplo, proteína A unida a una resina o matriz de fase sólida o), se refiere a la unión generalmente reversible de la molécula objetivo a un ligando a través de los efectos combinados de complementariedad espacial de, por ejemplo, las estructuras de la proteína y el ligando en un sitio de unión acoplado con fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno, fuerzas hidrófobas y/o fuerzas de van der Waals en el sitio de unión. Generalmente, cuanto mayor es la complementariedad especial y cuanto más fuerte sean las otras fuerzas en el sitio de unión, mayor será la especificidad de unión de una proteína para su ligando respectivo. Los ejemplos no limitativos de unión específica incluyen unión de anticuerpo-antígeno, unión de enzima-sustrato, unión de enzima-cofactor, quelación de iones metálicos, unión de proteína de unión a ADN-ADN, interacciones reguladoras proteína-proteína, y similares. De manera ideal, en la cromatografía de afinidad se produce unión específica con una afinidad de aproximadamente 10^{-4} a 10^{-8} M en disolución libre.

El término “detergente” se refiere a tensioactivos iónicos y no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbato 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Triton; dodecilsulfato de sodio (SDS); laurilsulfato de sodio; octilglicósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil-, o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-dimetilamina; metilcocoil-aurato de sodio o metiloleil-aurato de disodio; y la serie MONAQU AT™ series (Mona Industries, Inc., Paterson, N. J.). Detergentes útiles son un polisorbato, tal como polisorbato 20 (TWEEN 20®) o polisorbato 80 (TWEEN 80®) o diversos ácidos, tales como ácido octanoico.

Un “tampón” es una disolución que resiste cambios en el pH mediante la acción de sus componentes de conjugado ácido-base. Diversos tampones que pueden emplearse dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón se describen en Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975). Los ejemplos no limitativos de tampones incluyen tampones MES, MOPS, MOPSO, Tris, HEPES, fosfato, acetato, citrato, succinato y amonio, así como combinaciones de estos.

Según la presente invención, el término “tampón” o “disolvente” se usa para cualquier composición líquida que se use para cargar, lavar, eluir y reequilibrar las unidades de separación.

Cuando “se carga” una columna de separación se usa un tampón para cargar la muestra o composición que comprende la molécula objetivo (por ejemplo, una proteína objetivo que contiene una región Fc) y una o más impurezas sobre una columna de cromatografía (por ejemplo, una columna de afinidad o una columna de intercambio iónico). El tampón tiene una conductividad y/o pH de manera que la molécula objetivo se une a la matriz de cromatografía mientras que de manera ideal las impurezas no se unen y fluyen de manera continua a través de la columna.

Cuando “se carga” una columna de separación para “hacer fluir de manera continua” una molécula objetivo, se usa un tampón para cargar la muestra o composición que comprende la molécula objetivo (por ejemplo, una proteína objetivo que contiene una región Fc) y una o más impurezas sobre una columna de cromatografía (por ejemplo, una columna de afinidad o una columna de intercambio iónico). El tampón tiene una conductividad y/o pH de manera que la molécula objetivo no se une a la matriz de cromatografía y fluye de manera continua a través de la columna mientras que de manera ideal todas las impurezas se unen a la columna.

El término “reequilibrar” se refiere al uso de un tampón para reequilibrar la matriz de cromatografía antes de cargar la molécula objetivo. Normalmente, para reequilibrar se usa el tampón de carga.

Mediante “lavado” de una matriz de cromatografía quiere decirse hacer pasar un tampón apropiado a través o sobre la matriz. Normalmente, se usa lavado para retirar contaminantes débilmente unidos de la matriz antes de eluir la

molécula objetivo.

En este caso, normalmente, el tampón de lavado y el tampón de carga son el mismo. En caso de que se use un tampón de inactivación de virus, se usa para inactivar determinados virus presentes antes de eluir la molécula objetivo. En este caso, normalmente, el tampón de inactivación de virus difiere del tampón de carga puesto que puede contener detergente/detergentes o tener propiedades diferentes (pH/conductividad/sales y sus cantidades).

“Eluir” una molécula (por ejemplo, un polipéptido de interés o una impureza) de una matriz de cromatografía quiere decir retirar la molécula de la misma alterando las condiciones de disolución de manera que el tampón compite con la molécula de interés por los sitios de ligando en la resina de cromatografía. Un ejemplo no limitativo es eluir una molécula de una resina de intercambio iónico alterando la fuerza iónica del tampón que rodea el material de intercambio iónico de manera que el tampón compite con la molécula por los sitios cargados en el material de intercambio iónico.

El término “inactivación de virus”, o “VI” tal como se usa de manera intercambiable en el presente documento, se refiere a cualquier procedimiento que pueda hacer que un virus no pueda infectar una célula o que pueda inhibir una función viral a través de medios fisicoquímicos. Los métodos típicos de inactivación de virus incluyen, pero no se limitan a, tratamiento a pH bajo (por ejemplo, por debajo de pH 4,5, por debajo de 4,0 o por debajo de 3,8), tratamiento térmico, tratamiento con tensioactivos y radiación (por ejemplo, exposición a luz ultravioleta). En algunas realizaciones, los métodos de inactivación de virus se dirigen contra retrovirus.

En una realización particular, se usan condiciones de pH bajo para la inactivación de virus ya que tales condiciones normalmente alteran la envuelta lipídica del virus, inactivando de ese modo el virus.

En una realización particular, se usan determinados tensioactivos para la inactivación de virus ya que normalmente alteran el virus, inactivando de ese modo el virus (como Tween, Triton X-100, SDS).

Según la presente invención, una “unidad de separación” es un equipo sobre el que puede realizarse una etapa de separación cromatográfica. Una unidad de separación normalmente es una columna de cromatografía o cartucho de cromatografía que se llena con una matriz sorbente. Un experto en la técnica conoce columnas de cromatografía. Normalmente comprenden un tubo de columna con accesorios de extremo para la entrada de fluido y la salida de fluido. El tubo de columna se llena con una matriz de cromatografía adecuada.

Según la presente invención, un procedimiento “continuo” es un procedimiento que no se ejecuta en modo discontinuo. En un procedimiento continuo según la invención, se carga una nueva muestra sobre las unidades de separación A1 o A2 no sólo una vez sino secuencialmente de manera alternante o bien en la unidad de separación A1 o bien en la unidad de separación A2 con sólo pausas cortas o preferiblemente sin pausas entremedias.

Según la invención “secuencial” es dos veces o más de dos veces.

Según la presente invención, una “línea de conexión” es cualquier tubo, manguito, tubería o canal que es adecuado para hacer fluir líquidos a su través. Una línea de conexión puede estar interrumpida por una o más válvulas. Una línea de conexión podría ser recta o ramificada. Según la presente invención si dos partes de un aparato están “en conexión de fluido” significa que hay una línea de conexión entre las dos partes del aparato de modo que puede fluir líquido desde una parte hacia la otra. Esta línea de conexión puede ser directa o puede estar interrumpida por una o más válvulas, por una unidad de separación u otras partes del aparato. El término “en conexión de fluido” engloba una conexión de fluido que es permanente pero también engloba una conexión de fluido que no es permanente y está compuesta por una línea de conexión que está interrumpida, por ejemplo, por una o más válvulas de modo que el flujo de líquido a través de la línea de conexión puede iniciarse y detenerse cuando sea necesario. Normalmente, la mayoría de las partes del aparato que están en conexión de fluido tienen una conexión de fluido que no es permanente. Por ejemplo, si un depósito de tampón está en conexión de fluido con una unidad de separación, esto significa que puede producirse un flujo del tampón hacia la columna si es necesario, pero normalmente hay al menos una válvula ubicada en la línea de conexión entre el depósito y la unidad de separación de modo que el flujo de líquido puede detenerse cuando sea necesario e iniciarse cuando sea necesario. Si se produce realmente un flujo de líquido entre dos partes del aparato que están en conexión de líquido y, por tanto, se hace fluir líquido a través de la línea de conexión entre las dos partes, estas dos partes están en “comunicación de fluido”. Por consiguiente, “comunicación de fluido” según la presente invención describe el estado en que se usa realmente una “conexión de fluido” haciendo fluir líquido a través de la línea de conexión. Si dos partes del sistema están parcialmente en comunicación de fluido, significa que la comunicación de fluido no es permanente y que el líquido no está fluyendo permanentemente desde una parte hacia la otra sino sólo parte del tiempo. Normalmente, el flujo del líquido entre dos partes del sistema se inicia y/o se detiene con la ayuda de válvulas que dirigen el flujo de líquido.

Una “entrada de fluido” o “entrada” es cualquier medio que permite la introducción de líquido. Una entrada de la unidad de separación es, por ejemplo, el accesorio de extremo de una columna de cromatografía al que puede

conectarse una línea de conexión. Una entrada también puede ser una válvula que proporciona la introducción de líquido en una línea de conexión. Una entrada también puede ser el extremo de una línea de conexión.

5 Una "salida" o "salida de fluido" es cualquier medio que permite la retirada de un líquido. Una salida de la unidad de separación es, por ejemplo, el accesorio de extremo de una columna de cromatografía al que puede conectarse una línea de conexión. Una salida también puede ser una válvula que proporciona la introducción de líquido en una línea de conexión. Una salida también puede ser el extremo de una línea de conexión.

10 Una "válvula de selección de fluido" es cualquier medio que permite una comunicación de fluido selectivamente entre cualquier fluido conectado y la parte del sistema. Una válvula de selección de fluido es, por ejemplo, la válvula antes de la entrada de la unidad de separación, a la que pueden conectarse las líneas de conexión y elegirse selectivamente lo que puede permitir la comunicación de fluido entre la línea seleccionada y la entrada de la unidad de separación. Una válvula de selección de fluido es, por ejemplo, la válvula tras la salida de la unidad de separación a la que pueden conectarse las líneas de conexión y elegirse selectivamente lo que puede permitir la comunicación de fluido entre la línea seleccionada y la salida de la unidad de separación. Una válvula de selección de fluido también puede ser una válvula que proporciona la introducción de líquido en una línea de conexión. Una
15 válvula de selección de fluido también puede ser el extremo de una línea de conexión.

20 Una "válvula de selección de disolvente" es una válvula de selección de fluido que permite una comunicación de fluido selectivamente entre cualquier depósito de disolvente conectado y la parte del sistema. Una válvula de selección de disolvente es, por ejemplo, la válvula antes de la bomba de disolvente a la que pueden conectarse las líneas de conexión desde los depósitos de disolvente y elegirse selectivamente lo que puede permitir la comunicación de fluido entre el disolvente seleccionado y la bomba.

Una "válvula de selección de fluido" y una "válvula de selección de disolvente" pueden ser de tipo idéntico o de tipo diferente.

25 Un sistema de suministro de disolvente es un sistema que permite el suministro de líquido. Normalmente, el sistema de suministro de disolvente de un aparato comprende al menos un depósito y al menos una bomba para transportar el líquido desde el depósito hacia otra parte del aparato que está en conexión de líquido con el depósito. Un experto en la técnica conoce que cada vez que se transfiere líquido desde un depósito hacia una unidad de separación, esto se realiza con la ayuda de una bomba. Las bombas también pueden usarse para mezclar dos o más corrientes de líquido que proceden de dos o más depósitos.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención proporciona por primera vez un método y un aparato adecuados para un procedimiento de cromatografía continuo que sólo necesita tres columnas de separación. El procedimiento es un procedimiento de dos etapas que comprende dos etapas cromatográficas. Si el aparato tiene tres unidades de separación, la primera etapa cromatográfica (captura) se realiza de manera alternante y secuencial en dos unidades de separación, la segunda etapa cromatográfica (pulido) se realiza, también secuencialmente, en la tercera unidad de separación. Las
35 dos primeras unidades de separación que tienen la misma matriz de cromatografía se cargan alternativamente con la muestra. Esto significa que mientras que una de las unidades se carga con la muestra, al mismo tiempo, la otra unidad puede someterse a otras etapas de procedimiento como equilibración, lavado, elución de la molécula objetivo, etc. La tercera unidad de separación que tiene una matriz de cromatografía que es diferente de la matriz de las dos primera unidades se alimenta con la molécula objetivo que se eluye de las dos primera unidades. Puesto que
40 las dos primera unidades se cargan secuencialmente, también se eluyen secuencialmente. Esto significa que mientras que una unidad se carga, la otra unidad (ya cargada) se lava opcionalmente y entonces se eluye la molécula objetivo de esta unidad con un tampón de elución que permite preferiblemente la alimentación directa a la tercera unidad. Una vez realizada la segunda separación cromatográfica en la tercera unidad, entonces puede recuperarse la molécula objetivo purificada de la salida de fluido de la tercera unidad.

45 El método y el aparato según la presente invención permiten alta carga de las unidades de separación de primera dimensión dando como resultado altas capacidades de unión dinámica y rendimiento más rápido para acortar los tiempos de residencia.

50 Además, el método y el aparato según la presente invención permiten conectar la primera dimensión de separación (captura) con la segunda dimensión de separación (pulido) normalmente sin acondicionamiento adicional, puesto que el producto capturado se eluye preferiblemente de la primera dimensión en las condiciones, que se ajusta a la segunda dimensión (pulido).

El método según la presente invención puede aplicarse a diferentes modos cromatográficos, por ejemplo, captura con CIEX combinada con pulido con AIEX, captura con Prot A combinada con pulido con CIEX y captura con AIEX combinada con pulido con CIEX, sin cargas en el concepto y la solución tecnológica. Por tanto, no sólo es

económico, sino también una tecnología de purificación robusta adecuada para la purificación de una amplia variedad de moléculas objetivo (por ejemplo, moléculas biofarmacéuticas que tienen un pl de desde 2-14).

En una realización preferida, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de afinidad y la unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía de intercambio catiónico.

5 En otra realización preferida, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de afinidad y la unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía de intercambio aniónico.

En otra realización preferida, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de intercambio catiónico y la unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía de intercambio aniónico.

10 En otra realización, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de intercambio aniónico y la unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía de intercambio catiónico.

En otra realización, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de afinidad y la unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía en modo mixto.

15 En otra realización, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de afinidad y la unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía de intercambio aniónico y catiónico en modo mixto y una matriz de cromatografía de intercambio catiónico o una matriz de cromatografía de intercambio catiónico en modo mixto y de intercambio aniónico en modo mixto.

En otra realización, las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de intercambio catiónico y una unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía en modo mixto.

20 En la figura 2 se muestra una vista esquemática del aparato según la invención. En la figura 2, la línea de conexión entre las salidas de las unidades de separación A1 y A2 y la entrada de la unidad de separación B se denomina línea de conexión C-P. El aparato según la invención comprende tres unidades de separación, dos unidades de separación por captura A1 y A2 que tienen la misma matriz de cromatografía y una unidad de separación por pulido B. Además de las unidades de separación, normalmente comprende al menos dos bombas, una o más válvulas, conexiones de líquido y depósitos. Adicionalmente, puede comprender unidades de filtro, unidades de detección u otro equipo que puede ser necesario o adecuado en un procedimiento de separación cromatográfica. El aparato según la presente invención puede ser un sistema de cromatografía convencional o un sistema de un solo uso. Comprende columnas, válvulas, depósitos y otro equipo que se usa normalmente en los sistemas de cromatografía. Las unidades de separación podrían ser, por ejemplo, columnas de acero inoxidable, columnas de plástico o columnas de vidrio que se llenan con las matrices de cromatografía respectivas y tienen accesorios de extremo adecuados para la entrada y salida de disolvente.

35 En alguna realización, el aparato según la presente invención puede comprender más de tres unidades de separación, por ejemplo, podría tener 3 ó 4 unidades de separación por captura que tiene la misma matriz de cromatografía y 2 ó 3 unidades de separación por pulido que tienen la misma matriz de cromatografía pero una matriz de cromatografía que difiere de la matriz de las unidades de separación por captura. En realizaciones a modo de ejemplo puede tener

- dos unidades de separación por captura A1 y A2 en combinación con 2 unidades de separación por pulido B1 y B2

- tres unidades de separación por captura A1, A2 y A3 en combinación con 1 unidad de separación por pulido B

- tres unidades de separación por captura A1, A2 y A3 en combinación con 2 unidades de separación por pulido B1 y B2

40 En una realización preferida, el aparato según la presente invención tiene cinco unidades de separación, tres unidades de separación por captura A1, A2 y A3 que tienen la misma matriz de cromatografía y dos unidades de separación por pulido B1 y B2.

45 Para garantizar que o bien la salida de fluido de la unidad de separación A1 o bien la salida de fluido de la unidad de separación A2 o bien la salida de fluido de la unidad de separación A3 puedan estar en comunicación de fluido con la entrada de la unidad de separación B1 o con la entrada de la unidad de separación B2, al menos una válvula está ubicada entre las salidas de fluido de las unidades de separación A1, A2 y A3 y la entrada de fluido de las unidades de separación B1 y B2. Preferiblemente, hay una válvula ubicada tras la salida de cada unidad de separación A1 y A2 y A3, lo que permite una comunicación de fluido con la entrada de la unidad de separación B1 o con la entrada de la unidad de separación B2. El aparato también comprende al menos dos depósitos de tampón y al menos dos bombas, también denominado sistema de suministro de disolvente, que proporcionan el almacenamiento y la

50

5 provisión de los tampones necesarios, por ejemplo, para la carga, el lavado y la elución de las moléculas objetivo. Normalmente, las unidades de separación A1, A2 y A3 tienen al menos una entrada de fluido que está conectada a al menos un depósito de tampón y las unidades de separación B1 y B2 tienen al menos una entrada de fluido que está conectada a al menos un depósito de tampón. Normalmente, las unidades de separación B1 y B2 tienen al menos una salida de fluido.

En una realización muy preferida, el aparato según la presente invención tiene tres unidades de separación, dos unidades de separación por captura A1 y A2 que tienen la misma matriz de cromatografía y una unidad de separación por pulido B.

10 A continuación, la descripción del aparato y el método se centran en un aparato con dos unidades de separación por captura A1 y A2 que tienen la misma matriz de cromatografía y una unidad de separación por pulido B. Esto no pretende ser restrictivo sino hacer que la descripción sea más completa. Un experto en la técnica puede transferir la descripción también a sistemas con más de tres unidades, tal como se describió anteriormente.

15 Para garantizar que o bien la salida de fluido de la unidad de separación A1 o bien la salida de fluido de la unidad de separación A2 puedan estar en comunicación de fluido con la entrada de la unidad de separación B, al menos una válvula está ubicada entre las salidas de fluido de las unidades de separación A1 y A2 y la entrada de fluido de la unidad de separación B.

20 El aparato también comprende al menos dos depósitos de tampón y al menos dos bombas, también denominado sistema de suministro de disolvente, que proporcionan el almacenamiento y la provisión de los tampones necesarios, por ejemplo, para la carga, el lavado y la elución de las moléculas objetivo. Normalmente, para cada etapa cromatográfica, se necesita un tampón de carga y un tampón de elución.

25 En una realización de la presente invención, el aparato sólo comprende dos depósitos de tampón para los tampones de unión y elución, un depósito para el tampón A y un depósito para el tampón B. El tampón A es un tampón de carga y, por tanto, de unión para la primera dimensión que proporciona condiciones bajo las que se captura la molécula objetivo en las unidades de separación A1/A2. Además, el tampón A es un tampón de elución para la segunda dimensión que proporciona condiciones bajo las que se eluye la molécula objetivo de la unidad de separación B. El tampón B, es un tampón de elución para la primera dimensión (unidad de separación A1/A2), pero un tampón de unión para la segunda dimensión (unidad de separación B).

30 En otras realizaciones, el aparato puede comprender depósitos adicionales para otros tampones, limpieza *in situ*, inactivación de virus etc. Normalmente, los depósitos y las unidades de separación están conectados a través de líneas de conexión, válvulas y bombas. Las válvulas de selección de disolvente preferidas para la elección del disolvente antes de la bomba son válvulas que tienen 6 entradas de disolvente y 1 salida de disolvente que puede conectarse directamente a la bomba. Puede usarse cualquier bomba que garantice el flujo de disolvente incluyendo bombas peristálticas, bombas isocráticas, bombas de gradiente, bombas de alta presión y similares, bombas de baja presión y similares. Las válvulas de selección de fluido preferidas para la elección de la introducción de fluido antes de una entrada de parte de sistema son válvulas que tienen 6 entradas de fluido y 1 salida que puede conectarse a la entrada de la parte del sistema. Las válvulas de selección de fluido preferidas para la elección de la retirada de fluido tras la salida de la parte del sistema son válvulas que tienen 6 salidas de fluido y 1 entrada que puede conectarse a la salida de la parte del sistema.

40 En una realización preferida, el aparato comprende adicionalmente líneas de conexión entre las dos unidades de separación por captura A1 y A2 que permiten la conexión de líquido entre la salida de la columna A1 y la entrada de la columna A2 y viceversa. En la figura 3 se muestra una vista esquemática de esta realización, en donde las líneas de conexión adicionales se nombran línea de conexión F-F. Esta configuración permite una captura del producto lixiviado a partir de la primera unidad de separación por captura (al final de la carga) sobre la segunda unidad de separación (recién equilibrada y lista para la captura). Esto permite usar capacidades de unión y rendimientos superiores sin la pérdida de molécula objetivo.

45 En una realización preferida, se conecta un sistema de suministro de disolvente a las líneas de conexión entre las dos unidades de separación por captura A1 y A2, preferiblemente el sistema de suministro de disolvente de muestra con el fin de garantizar una alimentación de muestra continua a cualquier unidad de separación por captura seleccionada.

50 En otra realización preferida, el aparato comprende además uno o más detectores. Los detectores pueden usarse para controlar la transferencia de muestra entre las columnas, para el análisis de la calidad de la muestra, la monitorización, etc. Los detectores pueden ubicarse en cualquier sitio que sea adecuado, normalmente se ubican antes de la entrada de fluido y/o después de la salida de fluido de las columnas de separación.

Ejemplos de detectores adecuados son detectores de pH, detectores de UV, detectores de infrarrojos o detectores

que miden la conductividad.

Preferiblemente, los detectores se ubican antes de la entrada de fluido y después de la salida de fluido de todas las columnas de separación. Esta configuración garantiza el control de la transferencia de muestra entre las unidades de separación.

- 5 En otra realización preferida el aparato comprende además un sistema informático. Los detectores así como las bombas y válvulas están conectados al sistema informático. Este sistema informático permite el control de las bombas y válvulas y detectores. Preferiblemente, el sistema informático comprende un software y algoritmos que permiten que el aparato se use de un modo parcial o totalmente automatizado.

- 10 En otra realización preferida, se ubica una entrada de fluido adicional, que significa preferiblemente una línea de conexión a uno o más depósitos, antes de la entrada de fluido de la unidad de separación B. En las figuras 2, 3 y 4 esta entrada adicional se nombra entrada C. Normalmente la entrada de fluido adicional se ubica después de la salida de la unidad de separación A1 y A2 y antes de la entrada de fluido de la unidad de separación B. Preferiblemente, se ubica después de la válvula que está ubicada en la línea de conexión entre las salidas de las unidades de separación A1 y A2 y la entrada de fluido de la unidad de separación B y antes de la entrada de fluido de la unidad de separación B. Esto garantiza que la columna B no pueda alimentarse sólo con los eluatos de las unidades de separación A1 y A2 sino también con tampones o reactivos adicionales, por ejemplo para la dilución en línea, elución, equilibración, limpieza *in situ*, inactivación de virus, etc.

- 20 En otra realización preferida, el aparato comprende además un depósito adicional para limpieza *in situ*. La limpieza *in situ* (CIP) es una tecnología conocida por el experto en la técnica. La limpieza *in situ* es la eliminación de sustancias muy fuertemente unidas, precipitadas o desnaturalizadas de la matriz de cromatografía. Si tales contaminantes no se eliminan de la matriz de cromatografía, podrían afectar a las propiedades cromatográficas de la columna, disminuyendo la capacidad de unión y desprendiéndose en rondas posteriores lo que da como resultado que se transporten contaminantes o productos entre ciclos. Un protocolo de CIP convencional incluye normalmente de uno a cinco lavados con de uno a tres volúmenes de columna de tampones acuosos que comprenden componentes como

- 25 - clorhidrato de guanidina 6 M
- NaOH de 10 mM a 500 mM
- NaOH de 10 mM a 500 mM y NaCl 1 M,
- NaOH 50 mM y Na₂SO₄ 1 M,
- 30 - disolución de ácido fosfórico 150 mM,
- urea 6 M,
- etanol al 20%,
- etanol al 20% y ácido acético 0,5 M,
- etanol al 20% y ácido acético 2 M,
- 35 - Tween al 1% o tensioactivo Triton® X-100 o similar.

Concentración de los componentes como NaOH, el tiempo de contacto del tampón de CIP sobre la columna así como la frecuencia de realización de la CIP puede ajustarse y determinarse por el experto en la técnica.

- 40 El aparato según la presente invención tiene preferiblemente al menos un depósito que contiene un tampón de CIP. El tampón de CIP puede usarse para la CIP de todas unidades de separación si es adecuado. Entonces el depósito de tampón está en conexión de líquido con todas las unidades de separación de un modo que el flujo del tampón de CIP puede dirigirse a cada una de las columnas independientemente. En otra realización, el aparato comprende dos depósitos con dos tampones de CIP diferentes. Un depósito está en conexión de fluido con las unidades de separación A1 y A2, para lo que el flujo de la unidad de separación A1 y la unidad de separación A2 puede realizarse independientemente, el otro depósito está en conexión de fluido con la unidad de separación B. Pueden realizarse lavados de limpieza *in situ* tras cada ciclo de separación. Normalmente se realiza CIP tras cada segundo, tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno o décimo ciclo de separación dependiendo de la muestra y por tanto la cantidad y tipo de contaminantes que podrían contaminar la unidad de separación. Un experto en la técnica

es consciente del hecho de que la CIP puede omitirse o puede simplificarse drásticamente para sistemas de uso único.

5 En otra realización preferida, el aparato comprende un depósito adicional para la inactivación de virus (VI). La purificación de impurezas, especialmente la desactivación y eliminación de virus desempeñan el papel principal en la producción de compuestos biofarmacéuticos ya que los niveles de virus en compuestos biofarmacéuticos están regulados por la FDA. Es posible realizar la inactivación de virus en una etapa de purificación adicional, en donde, dependiendo de compuesto biofarmacéutico, la inactivación de virus puede realizarse por ejemplo mediante inactivación con disolvente/detergente, pasteurización, inactivación a pH ácido o inactivación con UV.

10 Se ha encontrado que cuando se usa el aparato según la presente invención y el procedimiento según la presente invención, es posible incluir también la inactivación de virus en el procedimiento de purificación. Para esto, o bien las unidades de separación A1 y A2 o bien la unidad de separación B o bien todas las unidades de separación están en conexión de fluido con un depósito adicional que contiene un tampón de inactivación de virus. El tampón de inactivación de virus fluye entonces a través de la unidad de separación sobre la que la inactivación de virus tendrá lugar mientras la molécula objetivo se une sobre la matriz de dicha unidad de separación. Preferiblemente las unidades de separación están conectadas con el depósito para la inactivación de virus o bien a bajo pH o bien con detergente o ambas, preferiblemente la etapa de inactivación de virus se realiza sobre matrices de intercambio catiónico. Si la inactivación de virus se realiza sobre las unidades de captura A1 y A2, el depósito que contiene el tampón de inactivación de virus está en conexión de fluido con las unidades de separación A1 y A2 de un modo que el flujo a la unidad de separación A1 y la unidad de separación A2 puede realizarse independientemente. Si la inactivación de virus se realiza sobre una unidad de pulido B, el depósito que contiene el tampón de inactivación de virus está en conexión de fluido con la unidad de separación B. Tampones adecuados para la inactivación de virus a pH bajo integrada son tampones con un pH ácido, preferiblemente tampones con un pH de entre 3 y 4. Ejemplos de tampones adecuados son acetato, glicina y otros. Tampones adecuados para la inactivación de virus con tensioactivos integrada son tampones con al menos un tensioactivo o detergente. Ejemplos de detergentes adecuados son ácido octanoico, Tween o tensioactivo Triton X-100. Realizar la etapa de inactivación de virus mientras la molécula objetivo está "sobre la columna", esto significa mientras está unida sobre la matriz de una unidad de separación, conduce a una reducción del número de etapas de purificación globales ya que se evita la inactivación de virus en la acumulación que se realiza normalmente además de las etapas de cromatografía.

30 En una realización preferida, el aparato no contiene ningún depósito para la acumulación. En procedimientos de separación cromatográfica conocidos, a menudo todas las fracciones que se eluyen de una primera columna y que contienen la molécula objetivo se acumulan en primer lugar antes de que se carguen sobre una segunda columna de cromatografía. Se ha encontrado que el método y aparato de la presente invención proporcionan una configuración en la que tal acumulación no es necesaria. Preferiblemente, cuando, tras cargar y lavar, la molécula objetivo se eluye de las unidades de separación A1 o A2, todo el eluyente que contiene la molécula objetivo se dirige directamente, sin acumulación, a la entrada de la unidad de separación B y se carga sobre la unidad de separación B. Esto acelera adicionalmente el procedimiento de purificación. Para esto, las unidades de separación A1 y A2 están en conexión de fluido con la unidad de separación B sin ningún depósito que interrumpa esta conexión. Esto se prefiere especialmente si el aparato comprende sólo dos depósitos de tampón para la unión y elución tal como se describió anteriormente. Si el modo de separación necesita el uso de más de dos tampones, también puede evitarse la acumulación introduciendo una entrada de fluido adicional antes de la entrada de fluido de la unidad de separación B (tal como se describió anteriormente) que puede usarse para la dilución en línea y el intercambio de tampón.

45 En una realización, el aparato comprende dos unidades de separación con una matriz de cromatografía de afinidad y una unidad de separación con una matriz de intercambio aniónico, preferiblemente de intercambio catiónico. Matrices de afinidad adecuadas son matrices que tienen grupos funcionales de proteína A, proteína G, proteína L o proteína r (por ejemplo Prosep® Highcap (Merck Millipore), Prosep® Ultra Plus (Merck Millipore), Poros® Prot A(Life Technologies), A650F (Tosoh), Mab-Select® Sure (GE). Matrices de intercambio catiónico adecuadas son matrices que tienen pero no se limitan a grupos de intercambio catiónico fuerte, tales como sulfopropilo, ácido sulfónico (Fractogel EMD ®SO₃, Fractogel EMD ® SE highcap (Merck) Eshmuno® S (Merck) SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ o SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™, de Pharmacia, o pero sin limitarse a grupos de intercambio catiónico débil, tales como ácido carboxílico como Fractogel ® EMD Carboxy (Merck).

55 En otra realización, el aparato comprende dos unidades de separación con una matriz de intercambio catiónico y una unidad de separación con una matriz de intercambio aniónico. Matrices de intercambio catiónico adecuadas son matrices que tienen pero sin limitarse a grupos de intercambio catiónico fuerte, tales como sulfopropilo, ácido sulfónico o que tienen pero sin limitarse a grupos de intercambio catiónico débil, tales como ácido carboxílico tales como los mencionados anteriormente. Matrices de intercambio aniónico adecuadas son matrices que tienen pero sin limitarse a uno o más ligandos cargados positivamente, tales como grupos amino cuaternarios. Las resinas de intercambio aniónico disponibles comercialmente incluyen DEAE celulosa, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ (Pharmacia), Fractogel® TMAE (M), Fractogel® TMAE HC (M) o Eshmuno® Q (Merck).

En otra realización, el aparato comprende dos unidades de separación con una matriz de intercambio aniónico y una unidad de separación con una matriz de intercambio catiónico. Se han enumerado anteriormente matrices de intercambio catiónico y matrices de intercambio aniónico adecuadas.

5 En todas realizaciones, también pueden usarse matrices de modo mixto en lugar de matrices de intercambio iónico así como combinaciones de las mismas. Un ejemplo es una combinación de intercambio aniónico y una funcionalidad hidrófoba (Capto Adhere (GE Healthcare) o una combinación de intercambio catiónico y una funcionalidad hidrófoba tal como (Capto™ MMC (GE Healthcare), Eshmuno® HCX (Merck KGaA), POROS®XS (Applied Biosystems).

10 La figura 1 muestra una realización preferida del aparato según la presente invención. Las columnas A1 y A2 se denominan "CIEX", mostrando que estas dos columnas tienen la misma matriz de cromatografía, por ejemplo una resina de intercambio catiónico. La columna B se denomina ALEX, sugiriendo que esta columna podría tener una matriz de cromatografía de intercambio aniónico. Se ubican detectores de conductividad ("Cond.") antes de la entrada de fluido de las tres columnas. Se ubican detectores de UV y pH ("UV, pH") en la salida de fluidos de las tres columnas. Las columnas A1 y A2 están conectadas con 6 depósitos para limpieza *in situ* ("CIP"), inactivación de virus ("VI"), tampón de carga ("E.A"), tampón de elución ("E.B"), un tampón de dilución ("Dil.") y la alimentación de muestra ("Alimentación"). La columna B está conectada a tres depósitos para limpieza *in situ* ("CIP"), tampón de carga ("E.A"), tampón de elución ("E.B"). Preferiblemente el tampón de elución usado para las columnas A1/A2 es el mismo que el tampón de carga usado para la columna B y viceversa. Los depósitos y las columnas están conectados por medio de líneas de conexión. Preferiblemente las líneas de conexión están interrumpidas al menos una vez por una válvula para poder controlar el flujo de líquido. El transporte de líquido se realiza con la ayuda de bombas.

15 La invención proporciona además un método para la purificación continua de una molécula objetivo a partir de una muestra que comprende la molécula objetivo y una o más impurezas. El método de la invención se realiza en el respectivo aparato de la invención. En las figuras 2, 3 y 4 se muestra una vista esquemática de un aparato adecuado. El método comprende repetir secuencialmente las etapas. Las unidades de separación A1 y A2 para la primera dimensión cromatográfica se cargan de manera continua, secuencial con la muestra de modo que mientras que la muestra se carga sobre la unidad de separación A1, la unidad de separación A2 está al menos en parte en comunicación de fluido con la unidad de separación B de modo que la molécula objetivo se eluye sobre la unidad de separación B y la unidad de separación A2 reequilibra y mientras que la muestra se carga en la unidad de separación A2, la unidad de separación A1 está al menos en parte en comunicación de fluido con la unidad de separación B de modo que la molécula objetivo se eluye sobre la unidad de separación B y la unidad de separación A1 se reequilibra.

Además, tiene lugar una segunda etapa de cromatografía sobre la unidad de separación B que conduce a la recuperación de la molécula objetivo purificada de la salida de fluido de la unidad de separación B.

35 Para garantizar que el método de la presente invención funciona en modo continuo, es necesario ajustar la velocidad de las dos etapas de separación cromatográfica. Normalmente, la carga, separación cromatográfica y reequilibración sobre la unidad de separación B en la segunda etapa cromatográfica son más rápidas que la carga, separación cromatográfica y reequilibración sobre las unidades de separación A1 y A2 de modo que la unidad de separación B está lista para una nueva carga vez que la molécula objetivo se eluye o bien de la unidad de separación A1 o bien de la unidad de separación A2. De lo contrario la elución de las moléculas objetivo de las unidades de separación A1 o A2 se retrasa hasta que la unidad de separación B está lista para la carga o podría integrarse en el sistema una segunda unidad de separación B2.

45 Cuando se realiza el método según la presente invención la elución de la molécula objetivo de las unidades de separación A1/A2 a la unidad de separación B significa que la fracción completa que contiene la molécula objetivo puede cargarse sobre la unidad de separación B o sólo partes de la fracción. Para reducir la cantidad de impurezas puede ser aconsejable cargar sólo las partes de la fracción que contienen la molécula objetivo sobre la unidad de separación B que contienen muy pocas impurezas. También es posible sacar una parte de la fracción de molécula objetivo para el control en procedimiento para analizar la pureza y otras propiedades de la molécula objetivo tras la primera etapa de separación.

50 A continuación se describen adicionalmente las siguientes realizaciones a modo de ejemplo. El marcaje de los componentes del aparato se refiere al marcaje usado en la figura 2.

A) Realizaciones en las que en ambas etapas de cromatografía (captura y pulido) la molécula objetivo se une a la matriz de la unidad de separación respectiva (modo de unión-unión):

En una realización, el método según la invención se realiza

5 a) alimentando la muestra sobre una columna de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras la columna de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras la unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, seguido por el lavado con tampón B, la elución de la molécula objetivo con tampón A y la reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

20 b) Alimentando la muestra sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo medio de intercambio catiónico) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la unidad de separación A con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A1 con la salida A1-W y la etapa de elución nombrada se realiza mientras se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, el lavado con tampón B, la elución de la molécula objetivo con tampón B, la elución de la molécula objetivo con tampón A y la reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida BW y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

35 Para el modo continuo preferiblemente, las etapas a) y b) se repiten al menos dos veces.

40 En una realización preferida mientras se alimenta la muestra sobre la unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2, para alcanzar cantidades especialmente altas de molécula objetivo unida sin pérdidas razonables, al final de la carga, esto significa que cuando la carga casi ha acabado, la salida de la unidad de separación A2 se conecta con la entrada de la unidad de separación A1 a través de una línea de conexión F-F para permitir la captura de la molécula objetivo que empieza a lixivarse de la unidad de separación A2 para que se una a la unidad de separación A1. Tan pronto como se detecte demasiada lixiviación de la molécula objetivo de la unidad de separación A2, la alimentación de la muestra se cambia de la unidad de separación A2 a unidad de separación A1. Mientras tanto la molécula objetivo en A1 se lava y se eluye sobre la unidad de separación B. Tras la reequilibración de la unidad de separación A1 se conecta su entrada a la salida de la columna de separación A2 para garantizar que la molécula objetivo que empieza a lixivarse de la unidad de separación A1 se una a la unidad de separación A2.

50 Esta conexión intermedia específica de las dos unidades de separación A1 y A2 proporciona la posibilidad única de ahorrar tiempo cargando las unidades de separación A1 y A2 con cantidades muy altas de molécula objetivo. En sistemas de cromatografía conocidos, normalmente, las columnas se cargan hasta aproximadamente del 60 al 80% de la capacidad de unión dinámica. El aparato y método según la presente invención con la conexión intermedia específica de las dos unidades de separación A1 y A2 ofrecen la posibilidad de cargar las unidades de separación A1 y A2 hasta más del 80% de la capacidad de unión dinámica, preferiblemente hasta del 80 al 95% de la capacidad de unión dinámica sin pérdida de molécula objetivo. La capacidad de unión dinámica de un medio de cromatografía es la cantidad de molécula objetivo a la que se unirá el medio en condiciones de flujo reales antes de que se produzca una penetración significativa de proteína no unida.

60 Si la muestra se carga sobre la unidad de separación A1 y especialmente cuando la carga casi ha acabado y la molécula objetivo comienza a lixivarse de la unidad de separación, la salida de la unidad de separación A1 puede conectarse con la entrada de la unidad de separación A2 de modo que la molécula objetivo que de lo contrario

- tendría que recogerse y ponerse en la alimentación de muestra de nuevo se alimenta directamente sobre la unidad de separación A2. Un experto en la técnica puede determinar cuándo es el mejor momento para detener la alimentación de muestra a la unidad de separación A1 y cambiar la alimentación de la muestra a la unidad de separación A2. Al mismo tiempo también se interrumpe la conexión de la salida de la unidad de separación A1 con la entrada de la unidad de separación A2 y mientras la unidad de separación A2 se carga adicionalmente con la alimentación de muestra, la unidad de separación A1 se lava y luego se pone en contacto con la entrada de la unidad de separación B para eluir la molécula objetivo sobre la unidad de separación B. Tras la reequilibración de la unidad de separación A1 se conecta de nuevo con la salida de la unidad de separación A2 para capturar la molécula objetivo que podría lixivarse de la columna A2 al final de la carga de la muestra.
- En la figura 3 se muestra una vista esquemática de un aparato adecuado para esta realización. Usando un aparato según la vista esquemática mostrada en la figura 3, el método de la invención puede realizarse por ejemplo tal como sigue:
- a) alimentando la muestra sobre una columna de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras la columna de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) a través de la línea de conexión CP directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras la unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, seguido por el lavado con tampón B, la elución de la molécula objetivo con tampón A y la reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).
 - b) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A1, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A2 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta a la entrada C para la reequilibración.
 - c) Alimentando la muestra sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo medio de intercambio catiónico) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la unidad de separación A con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A1 con la salida A1-W y la etapa de elución nombrada se realiza mientras se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, el lavado con tampón B, la elución de la molécula objetivo con tampón A y la reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).
 - d) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A2, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A1 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta a la entrada C para la reequilibración.

Para el modo continuo preferiblemente, las etapas a) to d) se repiten al menos dos veces.

Se ha encontrado que las pérdidas de molécula objetivo que resultan a menudo de la elución de molécula objetivo no unida durante el lavado pueden reducirse por el siguiente modo de realización del método según la invención:

5 En una realización preferida tras haberse cargado la unidad de separación A2 (o A1 respectivamente) hasta altas cantidades de molécula objetivo unida a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente), durante el lavado la molécula objetivo no unida se lava en la unidad de separación A1 para transferir la molécula objetivo no unida sin pérdidas razonables. Esto significa que cuando se acaba la carga, la salida de la unidad de separación A2 se conecta con la entrada de la unidad de separación A1, por ejemplo a través de una línea de conexión W-F, para permitir la captura de la molécula objetivo lavada de la unidad de separación A2 para que se una a la unidad de separación A1 (véase la figura 4). Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la
10 unidad de separación A2, se interrumpe la comunicación de fluido y la salida de la columna A2 se cambia a la posición de salida A2-W para extraer las moléculas no unidas. Mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A1, a medida que la molécula objetivo sobre la unidad de separación A2 se lava adicionalmente y se eluye sobre la unidad de separación B. Tras la reequilibración de la unidad de separación A2 se conecta su entrada a la salida de la columna de separación A1 para garantizar que la molécula objetivo que empieza a lixiviarse de la unidad de separación A1 se una a la unidad de separación A2.
15

Esta conexión intermedia específica de las dos unidades de separación A1 y A2 proporciona la posibilidad única de ahorrar tiempo y evitar pérdidas de molécula objetivo lavándolas. En sistemas de cromatografía conocidos, normalmente, la fracción de lavado de columna se extrae para desecharla o se recoge de nuevo en el depósito de alimentación. El aparato y método según la presente invención ofrecen la posibilidad de lavar las unidades de separación A1 y A2 con bajas pérdidas de molécula objetivo, preferiblemente hasta del 2 al 3% de pérdidas de molécula objetivo totales usando este procedimiento de purificación preferido.
20

En la figura 4 se muestra una vista esquemática de un aparato adecuado para esta realización. Usando un aparato según la vista esquemática mostrada en la figura 4, el método de la invención puede realizarse por ejemplo tal como sigue:

25 a) alimentando la muestra sobre una columna de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras la columna de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente)
30 para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) a través de la línea de conexión CP directamente para transferir la molécula objetivo
35 a la unidad de separación B, mientras la unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, seguido por el lavado con tampón B, la elución de la molécula objetivo con tampón A y la reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).
40

b) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A1, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y la molécula objetivo no unida se transfiera a columna A2 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W. Al mismo tiempo columna B se conecta con la entrada C para la reequilibración.
45

c) Cuando la carga de la unidad de separación A1 ha acabado, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A1 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A1 con una línea de conexión W-F con la unidad de separación A2, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A1, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A1 se cambia a la posición de salida A1-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A2 y se extraen las moléculas no unidas a través de la salida A2-W.
50

d) Alimentando la muestra sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo medio de intercambio catiónico) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un
55

5 primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la unidad de separación A con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A1 con la salida A1-W y la etapa de elución nombrada se realiza mientras se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) a través de línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, el lavado con tampón B, la elución de la molécula objetivo con tampón A y la reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

15 e) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A2, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A1 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta con la entrada C para la reequilibración.

20 f) cuando la carga de la unidad de separación A2 ha acabado, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A2 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A2 con una línea de conexión W-F con la unidad de separación A1, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A2, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A2 se cambia a la posición de salida A2-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraen a través de la salida A1-W.

Para el modo continuo preferiblemente, las etapas a) a f) se repiten al menos dos veces.

25 B) Realizaciones en las que en la primera etapa de cromatografía (captura) la molécula objetivo se une a la matriz de la unidad de separación respectiva y en la segunda etapa cromatográfica (pulido) la molécula objetivo se une débilmente o no se une a la matriz mientras se unen las impurezas (modo de unión-flujo continuo):

30 En una realización, las columnas de separación A1 y A2 para la primera dimensión cromatográfica se cargan de manera continua, secuencial con la muestra de modo que mientras que la muestra se carga sobre la columna de separación A1, la columna de separación A2 está al menos en parte en conexión de fluido con la columna B de modo que la molécula objetivo se eluye sobre la columna de separación B y la columna A2 se reequilibra y mientras que la muestra se carga sobre la columna de separación A2, la columna de separación A1 está al menos en parte en conexión de fluido con la columna B de modo que la molécula objetivo se eluye sobre la columna de separación B y la columna A1 se reequilibra.

35 Además, tiene lugar una segunda etapa de cromatografía en el modo de flujo continuo sobre la columna de separación B que conduce a la recuperación de la molécula objetivo purificada de la salida de fluido de la columna de separación B.

40 Para garantizar que el método de la presente invención funciona en el modo continuo, es necesario que las condiciones de elución de la etapa de separación cromatográfica de unión y elución se ajusten a las condiciones de carga para la etapa de flujo continuo realizada sobre la columna B. Si no es posible eluir la molécula objetivo de las unidades de separación A1 y A2 en condiciones que sean adecuadas para la carga sobre la unidad de separación B, normalmente, para ajustar condiciones de unión débil o condiciones de no unión de la molécula objetivo sobre la columna B, podría usarse una entrada C. Con el fin de obtener un rendimiento de unión débil o no unión óptimo y constante, son necesarias propiedades de disolución constantes, tales como pH y conductividad. Esto se realiza mientras se acondiciona la molécula objetivo que eluye de las unidades de separación A1 o A2 por medio de la entrada C por ejemplo mediante dilución en línea o intercambio de tampón. Algunas veces la purificación de productos biofarmacéuticos implica la separación de la molécula objetivo de impurezas muy similares y se requieren métodos de separación sensibles, tales como cromatografía de intercambio iónico débil. Con el método de la presente invención, puede hacerse separación por afinidad en el modo de unión y elución, y cromatografía de intercambio aniónico en condiciones de unión débil o no unión (flujo continuo) para la proteína objetivo. Se mostró que esto era una herramienta muy poderosa. Especialmente la combinación de varias matrices para este pulido de flujo continuo permite alcanzar la pureza de productos requerida por medio de la absorción de impurezas mediante varias funcionalidades diferentes, tales como intercambio catiónico o intercambio aniónico o funcionalidades hidrófobas y mezclas de los mismos. Para la etapa de cromatografía de flujo continuo, también es posible usar matrices de intercambio iónico muy débil o matrices de modo mixto débiles como carbono activado. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre materiales carbonosos, carbono activado y su uso en procedimiento de purificación de flujo continuo en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/575349, que se incorpora en el presente documento como referencia. A continuación se describen adicionalmente realizaciones a modo de

ejemplo. El marcaje de los componentes del aparato se refiere a al marcaje usado en la figura 2.

En una realización, el método según la invención se realiza

5 a) alimentando la muestra sobre una columna de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico o material de afinidad) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras que la columna de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico o material de afinidad) está conectada con la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico o un medio de modo mixto) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras que la unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una débilmente o no se una a la unidad de separación B seguido por reequilibración de la unidad de separación B con tampón B. Las etapas de reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y las etapas de alimentación se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

25 b) alimentando la muestra sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico o material de afinidad) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo medio de intercambio catiónico o material de afinidad) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico o material de afinidad) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la unidad de separación A con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A1 con la salida A1-W y la etapa de elución nombrada se realiza mientras se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico o medio de modo mixto) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una débilmente o no se una a la unidad de separación B, seguido por la reequilibración de la unidad de separación B con tampón B. Las etapas de reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y las etapas de alimentación se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

Para el modo continuo preferiblemente, las etapas a) y b) se repiten al menos dos veces.

40 En una realización preferida mientras se alimenta la composición sobre la unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico o material de afinidad) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2, para alcanzar cantidades especialmente altas de molécula objetivo unida sin pérdidas razonables, al final de la carga, esto significa que cuando la carga casi ha acabado, la salida de la unidad de separación A2 se conecta con la entrada de la unidad de separación A1 a través de una línea de conexión F-F para permitir la captura de la molécula objetivo que empieza a lixiviarse de la unidad de separación A2 para que se una a la unidad de separación A1 (véase la figura 3). Tan pronto como se detecte demasiada lixiviación de la molécula objetivo de la unidad de separación A2, se cambia la alimentación de muestra desde la unidad de separación A2 hasta la unidad de separación A1. Mientras tanto la molécula objetivo en A1 se lava y se eluye sobre la unidad de separación B. Tras la reequilibración de la unidad de separación A1, se conecta su entrada a la salida de la columna de separación A2 para garantizar que la molécula objetivo que empieza a lixiviarse de la unidad de separación A1 se una a la unidad de separación A2.

55 Esta conexión intermedia específica de las dos unidades de separación A1 y A2 proporciona la posibilidad única de ahorrar tiempo cargando las unidades de separación A1 y A2 con una cantidad muy alta de molécula objetivo. En sistemas de cromatografía conocidos, normalmente, las columnas se cargan hasta aproximadamente del 60 al 80% de la capacidad de unión dinámica. El aparato y método según la presente invención ofrecen la posibilidad de cargar las unidades de separación A1 y A2 hasta más del 80% la capacidad de unión dinámica, preferiblemente hasta del 80 al 95% de la capacidad de unión dinámica.

En la figura 3 se muestra una vista esquemática de un aparato adecuado para esta realización. Usando un aparato según la vista esquemática mostrada en la figura 3, el método de la invención puede realizarse por ejemplo tal como sigue:

5 a) alimentando la muestra sobre una columna de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico o material de afinidad) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras la columna de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico o material de afinidad) está conectada con la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico o medio de modo mixto) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras la unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una débilmente o no se una a la unidad de separación B, seguido por la reequilibración de la unidad de separación B con tampón B. Las etapas de reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y las etapas de alimentación se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

25 b) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A1, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A2 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta con la entrada C para la reequilibración.

30 c) Alimentando la muestra sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico o material de afinidad) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo medio de intercambio catiónico o material de afinidad) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico o material de afinidad) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la unidad de separación A con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A1 con la salida A1-W y la etapa de elución nombrada se realiza mientras se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico o medio de modo mixto) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una débilmente o no se una a la unidad de separación B, seguido por la reequilibración de la unidad de separación B con tampón B. Las etapas de reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapas de alimentación se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

45 d) cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A2, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A1 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta con la entrada C para la reequilibración.

Para el modo continuo preferiblemente, las etapas a) a d) se repiten al menos dos veces.

50 En una realización preferida cuando la unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico o material de afinidad) se carga con las cantidades especialmente altas de molécula objetivo unida sin pérdidas razonables a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición estaba a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2, la molécula objetivo no unida se lava en la unidad de separación A1 para transferir la molécula objetivo no unida sin pérdidas razonables. Esto significa que cuando se acaba la carga, la salida de la unidad de separación A2 se conecta con la entrada de la unidad de separación A1 a través de una línea de conexión W-F para permitir la captura de la molécula objetivo lavada de la unidad de separación A2 para que se una a la unidad de separación A1 (véase la figura 4). Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A2, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A2 se cambia a la posición de salida A2-W para

5 extraer las moléculas no unidas. Mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A1, a medida que la molécula objetivo sobre la unidad de separación A2 se lava adicionalmente y se eluye sobre la unidad de separación B. Tras la reequilibración de la unidad de separación A2 se conecta su entrada a la salida de la columna de separación A1 para garantizar que la molécula objetivo que empieza a lixivarse de la unidad de separación A1 se una a la unidad de separación A2.

10 Esta conexión intermedia específica de las dos unidades de separación A1 y A2 proporciona la posibilidad única de ahorrar tiempo y evitar pérdidas de molécula objetivo lavándolas. En sistemas de cromatografía conocidos, normalmente, la fracción de lavado de columna se extrae para desecharla o se recoge de nuevo en el depósito de alimentación. El aparato y método según la presente invención ofrecen la posibilidad de lavar las unidades de separación A1 y A2 con bajas pérdidas de molécula objetivo, preferiblemente hasta del 2 al 3% de pérdidas de molécula objetivo totales en el procedimiento de purificación preferido.

En la figura 4 se muestra una vista esquemática de un aparato adecuado para esta realización. Usando un aparato según la vista esquemática mostrada en la figura 4, el método de la invención puede realizarse por ejemplo tal como sigue:

15 a) alimentando la muestra sobre una columna de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico o material de afinidad) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras la columna de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico o material de afinidad) está conectada con la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras la unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 a las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una débilmente o no se una a la unidad de separación B, la reequilibración de la unidad de separación B con tampón B. Las etapas de reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y las etapas de alimentación se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

35 b) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A1, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y la molécula objetivo no unida se transfiera a columna A2 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W. Al mismo tiempo columna B se conecta con la entrada C para la reequilibración.

40 c) Cuando ha acabado la carga de la unidad de separación A1, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A1 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A1 con una línea de conexión W-F con la unidad de separación A2, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A1, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A1 se cambia a la posición de salida A1-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A2 y las moléculas no unidas se extraen a través de la salida A2-W.

45 d) Alimentando la muestra sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo medio de intercambio catiónico) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la unidad de separación A con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A1 con la salida A1-W y la etapa de elución nombrada se realiza mientras se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una débilmente o no se una a la unidad de separación B, seguido por la reequilibración de la unidad de separación B con tampón B. Las etapas de reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y las etapas de alimentación se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

5 e) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A2, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A1 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta con la entrada C para la reequilibración.

10 f) Cuando la carga de la unidad de separación A2 ha acabado, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A2 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A2 con una línea de conexión W-F con la unidad de separación A1, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A2, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A2 se cambia a la posición de salida A2-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraen a través de la salida A1-W.

Para el modo continuo preferiblemente, las etapas a) to f) se repiten al menos dos veces.

15 Se ha encontrado que en el método de la presente invención, preferiblemente se usan tampones que proporcionan unión y elución dependientes del pH. Se ha encontrado que especialmente la elución de las moléculas objetivo de las unidades de separación A1 y A2 es más eficaz y más rápida cuando se usa un tampón de elución con un pH que difiere del pH del tampón de carga. En otras palabras, el perfil de elución es más favorable cuando se usa un tampón de elución con un pH que difiere del pH del tampón de carga. La elución mediante un gradiente de pH se prefiere especialmente. Un experto en la técnica conoce tampones para la unión y elución dependientes del pH. Ejemplos de combinaciones de tampones adecuadas son PBS-glicina, acetato-TRIS y etc.

20 En una realización preferida el método de la invención comprende el uso de sólo dos tampones de carga y elución, el tampón A y el tampón B, de modo que el tampón A es un tampón de carga para la primera dimensión que proporciona condiciones en las que la molécula objetivo se captura sobre la columna de separación A1/A2. Además, el tampón A es un tampón de elución para la segunda dimensión que proporciona condiciones en las que la molécula objetivo se eluye de la columna de separación B. El tampón B es un tampón de elución para la primera dimensión (columna A1/A2), pero un tampón de captura para la segunda dimensión (columna B).

30 Si las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de afinidad como una matriz de Prot A, el tampón de unión (tampón A) tiene normalmente un pH de entre 6 y 8 y una concentración de sal (sales típicas son fosfato, acetato, cloruro, etc.) de entre 10 mM y 2 M. Se prefieren tampones de unión con un pH de entre 6,8 y 7,3 y una concentración de sal de entre 50 mM y 1 M. El tampón de elución tiene normalmente un pH de entre 2 y 5 y una concentración de sal (sales típicas son glicina, acetato, etc.) de entre 20 mM y 200 mM. Se prefieren tampones de elución con un pH de entre 2,5 y 4,5 y una concentración de sal de entre 20 mM y 50 mM. Si por ejemplo el tampón de elución tiene un pH de 4 este tampón que es adecuado para eluir la molécula objetivo de la matriz de Prot A de la unidad de separación A1 y A2 también es adecuado para cargar las moléculas objetivo sobre una unidad de separación B con una matriz de intercambio catiónico.

35 Si las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de intercambio catiónico, la unión del tampón de unión tiene normalmente un pH de entre 4 y 7 y una concentración de sal (sales típicas son fosfato, acetato, NaCl, etc.) de entre 10 mM y 300 mM. Se prefieren tampones de unión con un pH de entre 4,5 y 6 y una concentración de sal de entre 20 mM y 100 mM. El tampón de elución tiene normalmente un pH de entre 7 y 10 y una concentración de sal (sales típicas son TRIS, PBS, NaCl) de entre 10 mM y 300 mM. Se prefieren tampones de elución con un pH de entre 8 y 9 y una concentración de sal de entre 10 mM y 150 mM. Si por ejemplo el tampón de elución tiene un pH de 8,5 este tampón que es adecuado para eluir la molécula objetivo de la matriz de intercambio catiónico de la unidad de separación A1 y A2 también es adecuado para cargar las moléculas objetivo sobre una unidad de separación B con una matriz de intercambio aniónico.

45 Si las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de intercambio aniónico, el tampón de unión tiene normalmente un pH de entre 7 y 10 y una concentración de sal (sales típicas son TRIS, PBS, NaCl) de entre 10 mM y 300 mM. Se prefieren tampones de unión con un pH de entre 7,5 y 9,5 y una concentración de sal de entre 10 mM y 300 mM. El tampón de elución tiene normalmente un pH de entre 4 y 7 y una concentración de sal (sales típicas son PBS, acetato, NaCl, etc.) de entre 10 mM y 100 mM. Se prefieren tampones de elución con un pH de entre 4,5 y 6,5 y una concentración de sal de entre 10 mM y 100 mM. Si por ejemplo el tampón de elución tiene un pH de 5,5 este tampón que es adecuado para eluir la molécula objetivo de la matriz de intercambio aniónico de la unidad de separación A1 y A2 también es adecuado para cargar las moléculas objetivo sobre una unidad de separación B con una matriz de intercambio catiónico.

55 En una realización preferida, la muestra que se somete al método de la presente invención es una muestra clarificada. Esto significa que la muestra se somete a una etapa de clarificación antes de cargarla sobre las unidades de separación A1 o A2.

La etapa de clarificación pretende separar una o más impurezas solubles y/o insolubles de la molécula objetivo. Por ejemplo se eliminan impurezas insolubles como células y desechos celulares de la muestra dando como resultado un fluido clarificado que contiene la molécula objetivo en disolución así como otras impurezas solubles. Una etapa de clarificación puede implicar una o más de las siguientes, o bien solas o bien en cualquier combinación, centrifugación, sedimentación y/o filtración, preferiblemente filtración de flujo tangencial o filtración de profundidad. Preferiblemente la etapa de clarificación no implica centrifugación sino sólo filtración y/o sedimentación. En una realización preferida, la filtración es filtración de profundidad.

En algunas realizaciones, se usan filtros de profundidad para eliminar una o más impurezas insolubles. Los filtros de profundidad son filtros que usan un medio de filtración poroso para retener partículas por todo el medio, en vez de sólo en la superficie del medio. Una clase común de tales filtros de profundidad son los que comprenden una mezcla al azar de fibras unidas (o fijadas de otra forma), para formar un laberinto complejo, tortuoso de canales de flujo. La separación de partículas en estos filtros resulta generalmente resulta del atrapamiento mediante o la adsorción a, la matriz de fibras. El medio de filtro de profundidad más frecuentemente usado para el bioprocesamiento de caldos de cultivo celular y otras materias primas consiste habitualmente en fibras de celulosa, un adyuvante de filtración tal como DE (tierra de diatomeas), y un aglutinante de resina cargado positivamente.

Se ha encontrado que pueden lograrse resultados especialmente buenos en la eliminación primaria de impurezas particuladas si el filtro de profundidad poroso es anisotrópico. En algunas realizaciones, los poros tienen un tamaño de poro nominal que se clasifica > aproximadamente 25 µm. En algunas realizaciones, el filtro de profundidad comprende al menos 2 capas graduadas de fibras no tejidas, en el que las capas graduadas tienen un grosor total de aproximadamente 0,3 cm a aproximadamente 3 cm.

En algunas realizaciones, los filtros de profundidad comprenden un material compuesto de capas graduadas de fibras no tejidas, celulosa y tierra de diatomeas. Las fibras no tejidas comprenden polipropileno, polietileno, poliéster, nailon o mezclas de los mismos.

Pueden encontrarse filtros de profundidad a modo de ejemplo en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/571994, incorporada como referencia en el presente documento.

En algunas realizaciones, puede realizarse una etapa de centrifugación y/o filtración de flujo tangencial antes de una etapa de filtración de profundidad. Alternativamente, puede realizarse una etapa de filtración de profundidad sin necesidad de una etapa de centrifugación y/o filtración de flujo tangencial.

En una realización, antes de la clarificación mediante centrifugación y/o filtración y/o sedimentación, la muestra se trata previamente con una composición de precipitación para precipitar y eliminar contaminantes no deseados de la muestra. La composición de precipitación comprende al menos un agente precipitante que puede precipitar contaminantes como HCP, ADN, hormonas, etc. de la muestra. Los agentes precipitantes provocan la precipitación de un compuesto de un estado acuoso y/o soluble a un estado no acuoso y/o insoluble o agregan y aglutinan partículas finas a partir de una disolución, dando como resultado su sedimentación a partir de la fase líquida y una reducción en la turbidez de la disolución.

Ejemplos de agentes precipitantes adecuados son ácidos orgánicos (por ejemplo ácido octanoico), ácidos inorgánicos (por ejemplo HCl), otros agentes ácidos que disminuyen sustancialmente el pH hacia pH ácido, sales (por ejemplo, benzoato de sodio, colato de sodio, desoxicoltato de sodio, etc. otras sales monovalentes o ácidos orgánicos que precipitan en medio ácido). Otro ejemplo de un agente precipitante es un ácido graso de cadena corta tal como ácido caprílico. En condiciones ligeramente ácidas, la adición de ácidos grasos de cadena corta tales como ácido caprílico normalmente precipita proteínas distintas de IgG mientras IgG no precipita.

Otros agentes precipitantes adecuados son polímeros de polielectrolitos (véase, por ejemplo, la solicitud de patente PCT internacional n.º WO2008/091740, incorporada como referencia en el presente documento).

En una realización preferida, se usan polímeros sensibles a estímulos para precipitar una o más impurezas. Pueden encontrarse ejemplos de tales polímeros sensibles a estímulos, por ejemplo, en las publicaciones estadounidenses n.ºs 20080255027, 20090036651, 20090232737 y 20110020327, incorporadas como referencia en el presente documento. Los polímeros sensibles a estímulos son generalmente solubles en un disolvente de base acuosa en un determinado conjunto de condiciones de procedimiento tales como pH, temperatura y/o concentración de sal y se vuelven insolubles tras un cambio en one o más de tales condiciones y posteriormente precipitan. Los polímeros sensibles a estímulos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, polialilamina, polialilamina modificada con un grupo bencilo o polivinilamina y polivinilamina modificada con un grupo bencilo, en donde el estímulo es fosfato o citrato.

La composición de precipitación puede comprender además un detergente (Triton X-100, triton X-114, NP-40, Tween-20, OTD, SDS, CHAPS y/o polietilenglicol (PEG) (PEG-1000, PEG 10000) y/o poli(alcohol vinílico) y/o

polielectrolitos.

Los contaminantes precipitados se eliminan entonces de la muestra mediante clarificación antes de cargar la muestra sobre las unidades de separación.

5 En una realización preferida, la precipitación va seguida por filtración de profundidad, sin una etapa de centrifugación para proporcionar la muestra clarificada.

10 En una realización preferida la clarificación de la muestra se realiza simultáneamente con la purificación cromatográfica según el método de la presente invención durante al menos una parte de su duración. En otras palabras, la muestra líquida que contiene la molécula objetivo no se almacena en un tanque de acumulación tras la clarificación para esperar a que el volumen de muestra completo se clarifique sino que tan pronto como la muestra clarificada resulta del procedimiento de clarificación se usa de manera continua como disolución de muestra para el método de la presente invención y se carga sobre la unidad de separación A1 o A2.

15 Por consiguiente, el método de la presente invención también cuando usa una disolución de muestra clarificada no requiere el uso de tanques de acumulación que puedan almacenar el volumen completo de la disolución de muestra. Preferiblemente no se usa ningún tanque de acumulación o sólo tanques de acumulación que pueden almacenar menos del 25% preferiblemente menos del 10% del volumen total de la disolución de muestra.

20 En algunas realizaciones, podrían realizarse una o más etapas de purificación del flujo continuo adicionales tras realizar la segunda etapa cromatográfica sobre la unidad de separación B. Para esto, la salida de la unidad de separación B está en conexión de fluido con una o más unidades de separación adicionales. Una o más válvulas podrían estar ubicadas entre la salida de la unidad de separación B y la entrada de la primera unidad de separación adicional y/o en las líneas de conexión entre las unidades de separación adicionales opcionalmente siguientes (normalmente conectadas en serie) para garantizar la posibilidad de dilución en línea y/o intercambio de tampón. Las matrices de los dispositivos de flujo continuo adicionales se seleccionan normalmente de

- carbono activado

- intercambio catiónico

25 - modo mixto

- exclusión molecular

- intercambio aniónico

30 La molécula objetivo purificada que resulta del método según la presente invención puede someterse adicionalmente a etapas de procedimiento adicionales como etapas de formulación/esterilización/concentración, en donde la disolución que contiene molécula objetivo se esteriliza y se formula para que esté en un tampón deseado a una concentración deseada.

A continuación se enumeran realizaciones adicionales del método según la presente invención:

En un procedimiento a modo de ejemplo que comprende captura con CIEX y pulido con AIEX, el método según la invención se realiza

35 a) alimentando la muestra sobre una unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 (por ejemplo medio de intercambio catiónico) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras la unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada B

40 (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para las etapas de lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y reequilibración de la unidad de separación A1 con tampón A, en donde las etapas de lavado, reequilibración nombradas se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución nombrada se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio

45 aniónico) directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para las etapas de alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, lavado con tampón B, elución de la molécula objetivo con tampón A y reequilibración con tampón B en donde las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan

50 mientras se conecta la unidad de separación B con la salida BW y la etapa de elución se realiza mientras se conecta

la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

5 b) Alimentando la muestra sobre una unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 a altas cantidades de molécula objetivo unida sin pérdidas razonables mientras se conecta directamente la unidad de separación A1 con la unidad de separación A2 para permitir la captura de la molécula objetivo que empieza a lixiviarse de la unidad de separación A1 para que se una a la unidad de separación A2 en donde la unidad de separación A2 está conectada con la salida A2-W para extraer las moléculas no unidas, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para por ejemplo la reequilibración de la unidad de separación B mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B=W.

15 c) Alimentando la composición sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo medio de intercambio catiónico) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida B, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para las etapas de lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y reequilibración de la unidad de separación A1 con tampón A etapas, en donde las etapas de lavado, reequilibración nombradas se realizan mientras se conecta la unidad de separación A1 con la salida A1-W y la etapa de elución nombrada se realiza mientras se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para las etapas de alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, lavado con tampón B, elución de la molécula objetivo con tampón A y reequilibración con tampón B en donde las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

30 d) Alimentando la composición sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 a altas cantidades de molécula objetivo unida sin pérdidas razonables mientras se conecta directamente la unidad de separación A2 con la unidad de separación A1 para permitir la captura de la molécula objetivo que empieza a lixiviarse de la unidad de separación A2 para que se una a la unidad de separación A1 en donde la unidad de separación A1 está conectada con la salida A1-W para extraer las moléculas no unidas, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para por ejemplo la reequilibración de la unidad de separación B etapa mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W.) Diluyendo en línea la disolución de anticuerpo que eluye con un tercer tampón con el fin de unir el anticuerpo que eluye sobre el material de intercambio aniónico;

Preferiblemente, las etapas a) a d) se realizan secuencialmente, esto significa que se realizan en el mismo orden dos o más veces.

En una realización, el método comprende captura con CIEEX, alto rendimiento y pulido con AIEEX.

45 En procedimiento a modo de ejemplo que comprende captura con CIEEX, alto rendimiento, y pulido con AIEEX, el método según la invención se realiza

50 a) alimentando la muestra sobre una columna de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras la columna de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras la unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, seguido por el lavado

con tampón B, la elución de la molécula objetivo con tampón A y la reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

- 5 b) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A1, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y la molécula objetivo no unida se transfiera a columna A2 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta con la entrada C para la reequilibración.
- 10 c) Cuando la carga de la unidad de separación A1 ha acabado, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A1 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A1 con una línea de conexión W-F con la unidad de separación A2, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A1, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A1 se cambia a la posición de salida A1-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A2 y las moléculas no unidas se extraen a través de la salida A2-W.
- 15 d) Alimentando la muestra sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo medio de intercambio catiónico) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la unidad de separación A con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A1 con la salida A1-W y la etapa de elución nombrada se realiza mientras se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, el lavado con tampón B, la elución de la molécula objetivo con tampón A y la reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).
- 20 e) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A2, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A1 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta con la entrada C para la reequilibración.
- 25 f) Cuando la carga de la unidad de separación A2 ha acabado, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A2 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A2 con una línea de conexión W-F con la unidad de separación A1, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A2, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A2 se cambia a la posición de salida A2-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraen a través de salida A1-W.
- 30 Preferiblemente, las etapas a) a f) se realizan secuencialmente, esto significa que se realizan en el mismo orden dos o más veces.

En una realización, el método comprende captura con CIEX, inactivación de virus y pulido con AIEX (unión y elución o flujo continuo). En un procedimiento a modo de ejemplo que comprende captura con CIEX, inactivación de virus y pulido con AIEX, el método según la invención se realiza

- 50 a) alimentando la composición sobre una unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 (por ejemplo medio de intercambio catiónico) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras la unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para las etapas de lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la inactivación de virus con un tampón C a un segundo pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un tercer pH y la reequilibración de la unidad de separación A2 con tampón A, en
- 55

donde las etapas de lavado, inactivación de virus y reequilibración nombradas se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución nombrada se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para las etapas de alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, lavado con tampón B, elución de la molécula objetivo con tampón A y reequilibración con tampón B en donde las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

b) Alimentando la composición sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo medio de intercambio catiónico) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para las etapas de lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, inactivación de virus con un tampón C a un segundo pH, elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un tercer pH y reequilibración de la unidad de separación A1 con tampón A, en donde las etapas de lavado, inactivación de virus y reequilibración nombradas se realizan mientras se conecta la unidad de separación A1 con la salida A1-W y la etapa de elución nombrada se realiza mientras se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para las etapas de alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, lavado con tampón B, elución de la molécula objetivo con tampón A y reequilibración con tampón B en donde las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

Preferiblemente, las etapas a) a b) se realizan secuencialmente, esto significa que se realizan en el mismo orden dos o más veces.

En una realización, el método comprende captura con CIEEX, alto rendimiento, inactivación de virus y pulido con AIEEX. En un procedimiento a modo de ejemplo que comprende captura con CIEEX, alto rendimiento, inactivación de virus y pulido con AIEEX, el método según la invención se realiza

a) alimentando la muestra sobre una columna de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras la columna de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la etapa de inactivación de virus con un tampón de inactivación de virus, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado, inactivación de virus y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras la unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, seguido por lavado con tampón B, elución de la molécula objetivo con tampón A y reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

b) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A1, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A2 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta a la entrada C para la reequilibración.

c) Cuando la carga de la unidad de separación A1 ha acabado, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A1 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A1 con una línea de conexión W-F con la unidad de separación A2, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se

detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A1, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A1 se cambia a la posición de la salida A1-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A2 y las moléculas no unidas se extraen a través de la salida A2-W.

5 d) Alimentando la muestra sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio catiónico) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo medio de intercambio catiónico) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio catiónico) está conectada con la entrada B
10 (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la etapa de inactivación de virus con un tampón de inactivación de virus, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A1 con tampón A. Las etapas de lavado, inactivación de virus y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A1 con la salida A1-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio aniónico) a través de línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, el lavado con tampón B, la elución de la molécula objetivo con tampón A y la reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

25 e) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A2, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A1 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta a la entrada C para la reequilibración.

30 f) Cuando la carga de la unidad de separación A2 ha acabado, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A2 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A2 con una línea de conexión W-F con la unidad de separación A1, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A2, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A2 se cambia a la posición de salida A2-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraen a través de la salida A1-W.

35 Preferiblemente, las etapas a) a f) se realizan secuencialmente, esto significa que se realizan en el mismo orden dos o más veces.

En una realización, el método comprende captura con ProtA, pulido con CIEX (unión y elución) e inactivación de virus. En un procedimiento a modo de ejemplo que comprende captura con ProtA, pulido con CIEX (unión y elución) e inactivación de virus, el método según la invención se realiza realizando las siguientes etapas:

40 a) alimentación de la composición sobre una unidad de separación A1 (por ejemplo matriz de afinidad de columna de ProtA) a través de la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras la unidad de separación A2 (por ejemplo material de ProtA) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para las etapas de lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y reequilibración de la unidad de separación A1 con tampón A, en donde las etapas de lavado, reequilibración nombradas se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución nombrada se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio catiónico) directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para las etapas de alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, lavado con tampón B, inactivación de virus con tampón C y elución de la molécula objetivo con tampón A y reequilibración con tampón B en donde las etapas de alimentación, lavado, inactivación de virus y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

b) Alimentación de la composición sobre una unidad de separación A1 a través de la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la

molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 a altas cantidades de molécula objetivo unida sin pérdidas razonables mientras directamente se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación A2 para permitir la captura de la molécula objetivo que empieza a lixiviarse de la unidad de separación A1 para que se una a la unidad de separación A2 en donde la unidad de separación A2 está conectada con la salida A2-W para extraer las moléculas no unidas, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para por ejemplo la reequilibración de la unidad de separación B mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W.

c) Alimentación de la composición sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de ProtA) a través de la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo medio de ProtA) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo material de afinidad) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la unidad de separación A1 con tampón A etapas, en donde las etapas de lavado y reequilibración nombradas se realizan mientras se conecta la unidad de separación A1 con la salida A y la etapa de elución nombrada se realiza mientras se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio catiónico) directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para las etapas de alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, lavado con tampón B, inactivación de virus con un tampón C a un tercer pH, elución de la molécula objetivo con tampón A y reequilibración con tampón B en donde las etapas de alimentación, lavado, inactivación de virus y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

d) Alimentación de la composición sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de afinidad) a través de la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 a altas cantidades de molécula objetivo unida sin pérdidas razonables mientras directamente se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación A1 para permitir la captura de la molécula objetivo que empieza a lixiviarse de la unidad de separación A2 para que se una a la unidad de separación A1 en donde la unidad de separación A1 está conectada con la salida A1-W para extraer las moléculas no unidas, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para por ejemplo la reequilibración de la unidad de separación B mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W.

Preferiblemente, etapas a) a d) se realizan secuencialmente, esto significa que se realizan en el mismo orden dos o más veces.

En una realización, el método comprende captura con ProtA, alto rendimiento y pulido con CIEX. En un procedimiento a modo de ejemplo que comprende captura con ProtA, alto rendimiento y pulido con CIEX, el método según la invención se realiza

a) alimentando la muestra sobre una columna de separación A1 (por ejemplo matriz de afinidad de ProtA) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras la columna de separación A2 (por ejemplo matriz de afinidad de ProtA) está conectada con la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la etapa de inactivación de virus con un tampón de inactivación de virus, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado, inactivación de virus y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio catiónico) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras la unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, seguido por lavado con tampón B, elución de la molécula objetivo con tampón A y reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

b) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A1, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la

molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A2 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta con entrada C para la reequilibración.

5 c) Cuando la carga de la unidad de separación A1 ha acabado, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A1 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A1 con una línea de conexión W-F con la unidad de separación A2, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A1, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A1 se cambia a la posición de salida A1-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A2 y las moléculas no unidas se extraen a través de salida A2-W.

10 d) Alimentando la muestra sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo matriz de afinidad de ProtA) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo matriz de afinidad de ProtA) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo matriz de afinidad de ProtA) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la etapa de inactivación de virus con un tampón de inactivación de virus, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado, inactivación de virus y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A1 con la salida A1-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio catiónico) a través de línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, el lavado con tampón B, la elución de la molécula objetivo con tampón A y la reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

30 e) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A2, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A1 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta a la entrada C para la reequilibración.

35 f) Cuando la carga de unidad de separación A2 ha acabado, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A2 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A2 con una línea de conexión W-F con la unidad de separación A1, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A2, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A2 se cambia a la posición de salida A2-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraen a través de salida A1-W.

40 Preferiblemente, etapas a) a f) se realizan secuencialmente, esto significa que se realizan en el mismo orden dos o más veces.

En una realización, el método comprende captura con ProtA en el modo de unión elución, alto rendimiento y pulido de modo mixto en el modo de flujo continuo. En un procedimiento a modo de ejemplo que comprende captura con ProtA, alto rendimiento y pulido de modo mixto, el método según la invención se realiza

45 a) alimentando la muestra sobre una columna de separación A1 (por ejemplo matriz de afinidad de ProtA) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras la columna de separación A2 (por ejemplo matriz de afinidad de ProtA) está conectada con la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la etapa de inactivación de virus con un tampón de inactivación de virus, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado, inactivación de virus y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de modo mixto) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras la unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una débilmente o no se una a la unidad de separación B, seguido por la reequilibración con tampón B. Las etapas de reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad

de separación B con la salida B-W y la etapa de alimentación se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

5 b) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A1, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A2 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta con la entrada C para la reequilibración.

10 c) Cuando la carga de la unidad de separación A1 ha acabado, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A1 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A1 con una línea de conexión W-F con la unidad de separación A2, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A1, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A1 se cambia a la posición de salida A1-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A2 y las moléculas no unidas se extraen a través de salida A2-W.

15 d) Alimentando la muestra sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo matriz de afinidad de ProtA) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo matriz de afinidad de ProtA) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo matriz de afinidad de ProtA) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la etapa de inactivación de virus con un tampón de inactivación de virus, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado, inactivación de virus y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A1 con la salida A1-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A1 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio catiónico) a través de línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una débilmente o no se una a la unidad de separación B, seguido por la reequilibración con tampón B. Las etapas de reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de alimentación se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

35 e) cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A2, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A1 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta a la entrada C para la reequilibración.

40 f) Cuando la carga de la unidad de separación A2 ha acabado, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A2 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A2 con una línea de conexión W-F con la unidad de separación A1, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A2, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A2 se cambia a la posición de salida A2-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraen a través de salida A1-W.

Preferiblemente, las etapas a) a f) se realizan secuencialmente, esto significa que se realizan en el mismo orden dos o más veces.

45 En una realización, el método comprende captura con AIEX, alto rendimiento, pulido con CIEX (unión y elución) y inactivación de virus. En un procedimiento a modo de ejemplo que comprende captura con AIEX, alto rendimiento, pulido con CIEX (unión y elución) e inactivación de virus, el método según la invención se realiza

50 a) alimentando la muestra sobre una columna de separación A1 (por ejemplo material de intercambio aniónico) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W, mientras la columna de separación A2 (por ejemplo material de intercambio aniónico) está conectada con la entrada A (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la salida A2-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio catiónico) a través de la línea de conexión C-P directamente para transferir la molécula

objetivo a la unidad de separación B, mientras la unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A2 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, seguido por lavado con tampón B, etapa de inactivación de virus con un tampón de inactivación de virus, elución de la molécula objetivo con tampón A y reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado, inactivación de virus y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-W y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida BP para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

b) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A1, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A1 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A2 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta a la entrada C para la reequilibración.

c) Cuando la carga de la unidad de separación A1 ha acabado, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A1 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A1 con una línea de conexión W-F con unidad de separación A2, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A1, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A1 se cambia a la posición de salida A1-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A2 y las moléculas no unidas se extraen a través de salida A2-W.

d) Alimentando la muestra sobre una unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio aniónico) a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la composición está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 (por ejemplo material de intercambio aniónico) y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A2-W, mientras la unidad de separación A1 (por ejemplo material de intercambio aniónico) está conectada con la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para el lavado de la molécula objetivo unida con un tampón A a un primer pH, la elución de la molécula objetivo unida con tampón B a un segundo pH y la reequilibración de la columna de separación A2 con tampón A. Las etapas de lavado y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación A2 con la unidad de separación B (por ejemplo medio de intercambio catiónico) a través de línea de conexión CP directamente para transferir la molécula objetivo a la unidad de separación B, mientras una unidad de separación B está conectada con la entrada C (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) para la alimentación de la molécula objetivo desde la unidad de separación A1 en las condiciones que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación B, el lavado con tampón B, la etapa de inactivación de virus con un tampón de inactivación de virus, la elución de la molécula objetivo con tampón A y la reequilibración con tampón B. Las etapas de alimentación, lavado, inactivación de virus y reequilibración se realizan mientras se conecta la unidad de separación B con la salida BW y la etapa de elución se realiza mientras se conecta la unidad de separación B con la salida B-P para extraer la molécula objetivo purificada (por ejemplo anticuerpo).

e) Cuando la carga casi ha acabado sobre la columna A2, se carga además a través de la entrada B (por ejemplo sistema de suministro de disolvente) en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo (por ejemplo anticuerpo) se una a la unidad de separación A2 y la molécula objetivo no unida se transfiera a la columna A1 directamente a través de la línea de conexión F-F y las moléculas no unidas se extraigan a través de la salida A1-W. Al mismo tiempo la columna B se conecta a la entrada C para la reequilibración.

f) Cuando la carga de la unidad de separación A2 ha acabado, la molécula objetivo no unida de la unidad de separación A2 se lava usando la entrada A mientras se conecta la unidad de separación A2 con una línea de conexión W-F con la unidad de separación A1, que está cargándose a través de la entrada B. Tan pronto como se detecte poca molécula objetivo de la unidad de separación A2, se interrumpe la conexión y la salida de la columna A2 se cambia a la posición de salida A2-W para extraer las moléculas no unidas, mientras tanto la molécula objetivo se carga además sobre la unidad de separación A1 y las moléculas no unidas se extraen a través de salida A1-W.

Preferiblemente, las etapas a) a f) se realizan secuencialmente, esto significa que se realizan en el mismo orden dos o más veces.

El aparato y el método según la presente invención ofrecen por primera vez la posibilidad de un procedimiento cromatográfico de dos etapas que ahorra tiempo para la purificación de moléculas objetivo como anticuerpos. Si se necesita selectividad única, el procedimiento se realiza usando por ejemplo captura por afinidad y pulido por intercambio catiónico, y si se prefiere evitar un sorbente de afinidad, el procedimiento de purificación se realiza por medio del intercambio de la etapa de cromatografía de afinidad (Prot A) por la cromatografía de intercambio iónico usando captura catiónica y pulido aniónico o captura aniónica y pulido catiónico. Esto tiene la ventaja de tiempos de uso de la resina más prolongados, limpieza *in situ*, resinas baratas y puede aplicarse a múltiples compuestos biofarmacéuticos.

La optimización del procedimiento de purificación actual por medio de la inactivación de virus en columna permite acortar el tiempo de procesamiento. A menudo el tiempo de procesamiento se reduce hasta la mitad del tiempo o menos.

Ejemplos

5 Los siguientes ejemplos representan aplicaciones prácticas de la invención.

1.

La disolución de cultivo celular de anticuerpos monoclonales, que tenía anticuerpo monoclonal 0,9 mg/ml que componía una fracción del 17% de todos los componentes en la disolución (según SEC analítica), en donde la cantidad de HCP era de 600000 ng/mg de anticuerpo (según ensayo inmunoenzimático SP 2/0), se purificó sobre la resina Eshmuno™ S en el primer modo (que se parece a las columnas A1 y A2) y Capto™ Adhere en el segundo modo (que se parece a la columna B) en las siguientes condiciones. Condiciones de cromatografía: primer modo - se empaquetaron 33,5 ml de resina Eshmuno™ S en una columna de 16 x 150 mm; entonces se equilibró la columna con tampón fosfato 25 mM que contenía NaCl 20 mM, pH 4,5 a 30 ml/min (1000 cm/h). Segundo modo - se empaquetaron 33,5 ml de resina Capto™ Adhere en una columna de 16 x 150 mm; entonces se equilibró la columna con tampón TRIS 50 mM que contenía NaCl 20 mM, pH 9 a 15 ml/min (500 cm/h). Para preparar la muestra: se diluyó la disolución de cultivo celular de anticuerpos monoclonales 1:2 con agua, se añadió ácido caprílico al 0,5% mientras se agitaba durante 10 minutos. Se permitió que el precipitado formado se sedimentara durante otros 20 minutos. Se filtró la disolución obtenida a través de un filtro de 0,45 µm y tituló a pH 5,5, conductividad a aproximadamente 6 mS/cm. Se cargaron 3000 ml de muestra sobre la columna de Eshmuno™ S y se lavó posteriormente la columna con acetato 25 mM, pH 4,6. Entonces se lavó la columna con fosfato 25 mM, pH 6,3. Entonces se redujo la velocidad de flujo hasta 300 cm/h (10 ml/min) y se eluyó el anticuerpo con 10 volúmenes de columna en un gradiente lineal hasta TRIS 50 mM, NaCl 20 mM, pH ~7,5 (cond. aproximadamente 3,3 mS/cm) sobre la columna de Capto™ Adhere. Se usó dilución en línea con tampón TRIS 50 mM para aumentar el valor de pH de la disolución que eluía hasta 8,5. Entonces se lavó posteriormente la columna de Capto™ Adhere con un tampón TRIS 50 mM, pH 8,5, y se eluyó el anticuerpo con 10 volúmenes de columna en un gradiente lineal hasta ácido cítrico 10 mM, fosfato 10 mM y NaCl 20 mM, pH 3,5. La fracción eluida contenía anticuerpo 3,2 mg/ml, que componía el 99,9% de todos los componentes (según SEC analítica), en donde la cantidad de HCP era de 33 ng/mg de anticuerpo (según ensayo inmunoenzimático SP 2/0). Tras la elución, se separaron ambas columnas con NaCl 1 M, luego NaOH 1 M.

30 2. Captura de cationes + flujo continuo de aniones

La disolución de cultivo celular de anticuerpos monoclonales, que tenía anticuerpo monoclonal 0,9 mg/ml que componía una fracción del 17% de todos los componentes en la disolución (según SEC analítica), en donde la cantidad de HCP era de 600000 ng/mg de anticuerpo (según ensayo inmunoenzimático SP 2/0), se purificó sobre la resina Eshmuno™ S en el primer modo (que se parece a las columnas A1 y A2) y Fractogel™ TMAE (M) en el segundo modo (que se parece a la columna B) en las siguientes condiciones. Condiciones de cromatografía: primer modo - se empaquetaron 33,5 ml de resina Eshmuno™ S en una columna de 16 x 150 mm; entonces se equilibró la columna con tampón fosfato 25 mM que contenía NaCl 20 mM, pH 4,5 a 30 ml/min (1000 cm/h). Segundo modo - se empaquetaron 33,5 ml de resina Fractogel™ TMAE (M) en una columna de 16 x 150 mm; entonces se equilibró la columna con tampón TRIS 50 mM que contenía NaCl 20 mM, pH 8,6 a 15 ml/min (500 cm/h). Para preparar la muestra: se diluyó la disolución de cultivo celular de anticuerpos monoclonales 1:2 con agua, se añadió ácido caprílico al 0,5% mientras se agitaba durante 10 minutos. Se permitió que el precipitado formado se sedimentara durante otros 20 minutos. Se filtró la disolución obtenida a través de un filtro de 0,45 µm y se tituló a pH 5,5, conductividad a aproximadamente 6 mS/cm. Se cargaron 3000 ml de muestra sobre la columna de Eshmuno™ S y se lavó posteriormente la columna con acetato 25 mM, pH 4,6. Entonces se lavó la columna con fosfato 25 mM, pH 6,3. Entonces se redujo la velocidad de flujo hasta 300 cm/h (10 ml/min) y se eluyó el anticuerpo con 10 volúmenes de columna con TRIS 100 mM, NaCl 20 mM, pH ~8,5 (cond. aproximadamente 4,6 mS/cm) sobre la columna de Fractogel™ TMAE (M). Se usó dilución en línea con tampón TRIS 100 mM para mantener el valor de pH de la disolución que eluía a 8,6. Entonces se lavó posteriormente la columna de Fractogel™ TMAE (M) con un tampón TRIS 50 mM, pH 8,5, y se retiró por lavado el anticuerpo restante con 2 volúmenes de columna. El flujo continuo contenía anticuerpo 2,8 mg/ml, que componía el 99,9% de todos los componentes (según SEC analítica), en donde la cantidad de HCP era de 30 ng/mg de anticuerpo (según ensayo inmunoenzimático SP 2/0). Tras la elución para la columna de Eshmuno™ S y el lavado para la de Fractogel™ TMAE (M), se separaron ambas columnas con NaCl 1 M, luego NaOH 1 M.

3. Captura de ProtA + pulido de cationes

55 La disolución de cultivo celular de anticuerpos monoclonales, que tenía anticuerpo monoclonal 0,9 mg/ml que componía una fracción del 17% de todos los componentes en la disolución (según SEC analítica), en donde la

cantidad de HCP era de 600000 ng/mg de anticuerpo (según ensayo inmunoenzimático SP 2/0), se purificó sobre la resina Prosep® Ultra Plus en el primer modo (que se parece a las columnas A1 y A2) y EshmunTM S en el segundo modo (que se parece a la columna B) en las siguientes condiciones. Condiciones de cromatografía: primer modo - se empaquetaron 33,5 ml de resina Prosep Ultra® Plus en una columna de 16 x 150 mm; entonces se equilibró la columna con tampón fosfato 25 mM que contenía NaCl 20 mM, pH 7,2 a 30 ml/min (1000 cm/h). Segundo modo - se empaquetaron 33,5 ml de resina EshmunTM S en una columna de 16 x 150 mm; entonces se equilibró la columna con tampón glicina 10 mM que contenía NaCl 20 mM, pH 4,0 a 30 ml/min (1000 cm/h). Para preparar la muestra: se filtró la disolución de cultivo celular de anticuerpos monoclonales a través de un filtro de 0,45 µm y se tituló a pH 7,2, conductividad a aproximadamente 16 mS/cm. Se cargó una muestra de 1500 ml sobre la columna de Prosep® Ultra Plus y se lavó posteriormente la columna con tampón fosfato 25 mM que contenía NaCl 20 mM, pH 7,2. Entonces se redujo la velocidad de flujo hasta 300 cm/h (10 ml/min) y se eluyó el anticuerpo con 10 volúmenes de columna con tampón glicina 10 mM que contenía NaCl 20 mM, pH ~5,0, (cond. aproximadamente 3,6 mS/cm) sobre la columna de EshmunTM S. Se usó dilución en línea con tampón glicina 10 mM para mantener el valor de pH de la disolución que eluía a ~5,5. Entonces se lavó posteriormente la columna de EshmunTM S con un tampón glicina 10 mM, pH 4,0, y se eluyó el anticuerpo con 10 volúmenes de columna en un gradiente lineal hasta tampón fosfato 25 mM que contenía NaCl 20 mM, pH 7,2. La fracción de elución contenía anticuerpo 4,5 mg/ml, que componía el 99,9% de todos los componentes (según SEC analítica), en donde la cantidad de HCP era de 40 ng/mg de anticuerpo (según ensayo inmunoenzimático SP 2/0). Tras la elución, se separó la columna de Prosep Ultra Plus con H₃PO₄ 0,15 M, y la columna de EshmunTM S con NaCl 1 M y luego NaOH 1 M.

20 4. Captura de ProtA + flujo continuo de intercambio iónico mixto

La disolución de cultivo celular de anticuerpos monoclonales, que tenía anticuerpo monoclonal 1,25 mg/ml que componía una fracción del 10% de todos los componentes en la disolución (según SEC analítica), en donde la cantidad de HCP era de 250000 ng/mg de anticuerpo (según ensayo inmunoenzimático CHO), se purificó sobre la resina Prosep®-vA High Capacity en el primer modo (que se parece a las columnas A1 y A2) y EshmunTM S y Fractogel® TMAE Hicap en el segundo modo (que se parece a la columna B) en las siguientes condiciones. Condiciones de cromatografía: primer modo - se empaquetaron 17,3 ml de resina Prosep®-vA High Capacity en una columna de 16 x 8,6 mm; entonces se equilibró la columna con tampón TRIS 25 mM que contenía NaCl 20 mM, pH 7,0 a 30 ml/min (1000 cm/h). Segundo modo - se empaquetaron 16,75 ml de resina EshmunTM S en una columna de 16 x 75 mm y se empaquetaron 16,75 ml de resina Fractogel® TMAE Hicap en una columna de 16 x 75 mm, combinando ambas columnas en una unidad de separación; entonces se equilibró esta unidad de separación con tampón TRIS 25 mM que contenía NaCl 20 mM, pH 7,4 a 30 ml/min (1000 cm/h). Para preparar la muestra: se filtró la disolución de cultivo celular de anticuerpos monoclonales a través de un filtro de profundidad que tenía poros de 0,8 µm y 0,2 µm y se tituló a pH 7,2, conductividad a aproximadamente 18 mS/cm. Se cargaron 220 ml de muestra sobre la columna de Prosep®-vA High Capacity y se lavó posteriormente la columna con tampón TRIS 25 mM que contenía NaCl 500 mM, pH 7,2. Entonces se redujo la velocidad de flujo hasta 300 cm/h (10 ml/min) y se eluyó el anticuerpo con 10 volúmenes de columna con tampón glicina 10 mM que contenía NaCl 20 mM, pH ~4,0, (cond. aproximadamente 3,6 mS/cm) sobre la columna de EshmunTM S/Fractogel® TMAE Hicap. Se usó dilución en línea con tampón TRIS 100 mM para mantener el valor de pH de la disolución que eluía a ~7,4. El flujo continuo contenía anticuerpo 5,67 mg/ml, que componía el 99,9% de todos los componentes (según SEC analítica), en donde la cantidad de HCP era <50 ng/mg de anticuerpo (según ensayo inmunoenzimático CHO). Tras la elución, se separó la columna de Prosep®-vA High Capacity con H₃PO₄ 0,15M y la columna EshmunTM S/Fractogel® TMAE Hicap con NaCl 1 M y luego NaOH 1 M.

5. Captura de ProtA + flujo continuo en modo mixto

La disolución de cultivo celular de anticuerpos monoclonales, que tenía anticuerpo monoclonal 1,25 mg/ml que componía una fracción del 10% de todos los componentes en la disolución (según SEC analítica), en donde la cantidad de HCP era de 250000 ng/mg de anticuerpo (según ensayo inmunoenzimático CHO), se purificó sobre la resina Prosep®-vA High Capacity en el primer modo (que se parece a las columnas A1 y A2) y EshmunTM S y Fractogel® TMAE Hicap en el segundo modo (que se parece a la columna B) en las siguientes condiciones. Condiciones de cromatografía: primer modo - se empaquetaron 17,3 ml de resina Prosep®-vA High Capacity en una columna de 16 x 8,6 mm; entonces se equilibró la columna con tampón TRIS 25 mM que contenía NaCl 20 mM, pH 7,0 a 30 ml/min (1000 cm/h). Segundo modo - se empaquetaron 16,75 ml de resina CaptoTM Adhere en una columna de 16 x 75 mm y se empaquetaron 16,75 ml de resina CaptoTM MMC en una columna de 16 x 75 mm, combinando ambas columnas en una unidad de separación; entonces se equilibró esta unidad de separación con tampón TRIS 25 mM que contenía NaCl 50 mM, pH 7,4 a 30 ml/min (1000 cm/h). Para preparar la muestra: se filtró la disolución de cultivo celular de anticuerpos monoclonales a través de un filtro de profundidad que tenía poros de 0,8 µm y 0,2 µm y se tituló a pH 7,2, conductividad a aproximadamente 18 mS/cm. Se cargaron 220 ml de muestra sobre la columna de Prosep®-vA High Capacity y se lavó posteriormente la columna con tampón TRIS 25 mM que contenía NaCl 500 mM, pH 7,2. Entonces se redujo la velocidad de flujo hasta 300 cm/h (10 ml/min) y se eluyó el anticuerpo con 10 volúmenes de columna con tampón glicina 50 mM que contenía NaCl 50 mM, pH ~4,0, (cond. aproximadamente 7,6 mS/cm) sobre la columna de CaptoTM Adhere/CaptoTM MMC. Se usó dilución en línea con

tampón TRIS 100 mM para mantener el valor de pH de la disolución que eluía a ~7,2. El flujo continuo contenía anticuerpo 6,15 mg/ml, que componía el 99,9% de todos los componentes (según SEC analítica), en donde la cantidad de HCP era <30 ng/mg de anticuerpo (según ensayo inmunoenzimático CHO). Tras la elución, se separó la columna de Prosep®-vA High Capacity con H₃PO₄ 0,15 M y la columna de Capto™ Adhere/Capto™ MMC con NaCl 1 M y luego NaOH 1 M.

5

REIVINDICACIONES

1. Aparato que comprende

5 - dos unidades de separación A1 y A2 que tienen ambas la misma matriz de cromatografía y una unidad de separación B que tiene una matriz de cromatografía que difiere de la matriz de cromatografía de las unidades de separación A1 y A2, teniendo todas las unidades de separación una entrada de fluido y una salida de fluido, para lo que hay al menos conexión de fluido entre la salida de fluido de la unidad de separación A1 y la entrada de fluido de la unidad de separación B y conexión de fluido entre la salida de fluido de la unidad de separación A2 y la entrada de fluido de la unidad de separación B

10 - al menos una válvula en la conexión de fluido entre las unidades de separación A1 y A2 y la unidad de separación B que permite cambiar entre comunicación de fluido entre la salida de la unidad de separación A1 y la entrada de fluido de la unidad de separación B y comunicación de fluido entre la salida de la unidad de separación A2 y la entrada de fluido de la unidad de separación B

15 - al menos dos depósitos de tampón y al menos dos bombas para lo que los depósitos de tampón están al menos en conexión de fluido con las entradas de las unidades de separación A1 y A2 y las bombas se usan para transportar el líquido desde los depósitos hacia las unidades de separación conteniendo un depósito una disolución de muestra que está en conexión de fluido con las entradas de las unidades de separación A1 y A2.

2. Aparato según la reivindicación 1, caracterizado porque las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de afinidad, una de intercambio catiónico, una de intercambio catiónico en modo mixto o una de intercambio aniónico.

20 3. Aparato según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía de intercambio catiónico, una de intercambio aniónico en modo mixto o una de intercambio aniónico.

4. Aparato según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de afinidad y la unidad de separación B tiene una matriz de cromatografía de intercambio catiónico, una de intercambio aniónico en modo mixto o una de intercambio aniónico.

25 5. Aparato según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las unidades de separación A1 y A2 tienen una matriz de cromatografía de intercambio catiónico o de intercambio catiónico en modo mixto y la unidad de separación B tiene una matriz de afinidad de intercambio aniónico o una de intercambio aniónico en modo mixto.

30 6. Aparato según una o más de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el aparato comprende además una línea de conexión entre la salida de fluido de la unidad de separación A1 y la entrada de fluido de la unidad de separación A2 y una línea de conexión entre la salida de fluido de la unidad de separación A2 y la entrada de fluido de la unidad de separación A1.

7. Aparato según una o más de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el aparato comprende una entrada de fluido en la línea de conexión entre las salidas de las unidades de separación A1 y A2 y la entrada de fluido de la unidad de separación B.

35 8. Aparato según una o más de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el aparato comprende un depósito adicional con tampón de inactivación de virus que está al menos en conexión de fluido con la entrada de una de las tres unidades de separación.

40 9. Aparato según una o más de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el aparato comprende al menos un depósito adicional con tampón para limpieza *in situ* que está al menos en conexión de fluido con la entrada de una de las tres unidades de separación.

10. Método de purificación continua de una molécula objetivo de una o más impurezas en una muestra usando un aparato según una o más de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo el método las etapas de

45 - cargar alternativamente la muestra en las unidades de separación A1 y A2 de modo que mientras que la muestra se carga en la unidad de separación A1, en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación A1, la unidad de separación A2 está al menos parte de ese tiempo en comunicación de fluido con la unidad de separación B de modo que la molécula objetivo cargada en la unidad de separación A2 se eluye sobre la unidad de separación B y la unidad de separación A2 se reequilibra, y mientras que la muestra se carga en la unidad de separación A2 en la que la muestra está a un primer pH y conductividad que permiten que la molécula objetivo se una a la unidad de separación A2, la unidad de separación A1 está al menos parte de ese tiempo en comunicación de fluido con la unidad de separación B de modo que la

50

molécula objetivo cargada en la unidad de separación A1 se eluye sobre la unidad de separación B y la unidad de separación A1 se reequilibra

- recuperar la molécula objetivo de la salida de fluido de la unidad de separación B.

11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque la molécula objetivo es un anticuerpo.

5 12. Método según una o más de las reivindicaciones 10 a 11, caracterizado porque mientras se carga la muestra sobre la unidad de separación A1, la salida de fluido de la unidad de separación A1 está al menos parte de ese tiempo en comunicación de fluido con la entrada de fluido de la unidad de separación A2 para permitir la captura de la molécula objetivo que empieza a lixiviarse de la columna de separación A1 para que se una a la columna de separación A2 y mientras se carga la muestra sobre la unidad de separación A2, la salida de fluido de la unidad de separación A2 está al menos parte de ese tiempo en comunicación de fluido con la entrada de fluido de la unidad de separación A1 para permitir la captura de la molécula objetivo que empieza a lixiviarse de la columna de separación A2 para que se una a la columna de separación A1.

10 13. Método según una o más de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado porque se bombea un tampón de inactivación de virus a través de la unidad de separación A1 tras cargar la unidad de separación A1 con la molécula objetivo y a través de la unidad de separación A2 tras cargar la unidad de separación A2 con la molécula objetivo.

15 14. Método según una o más de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado porque, mientras se lava la muestra no unida de la unidad de separación A1, la unidad de separación A2 está al menos parte de ese tiempo en comunicación de fluido con el depósito que contiene disolución de muestra y con la unidad de separación A1 y mientras se lava la muestra no unida de la unidad de separación A2, la unidad de separación A1 está al menos parte de ese tiempo en comunicación de fluido con el depósito que contiene disolución de muestra y con la unidad de separación A2.

20 15. Método según una o más de las reivindicaciones 10 a 14, caracterizado porque la muestra es una muestra clarificada.

Fig. 1

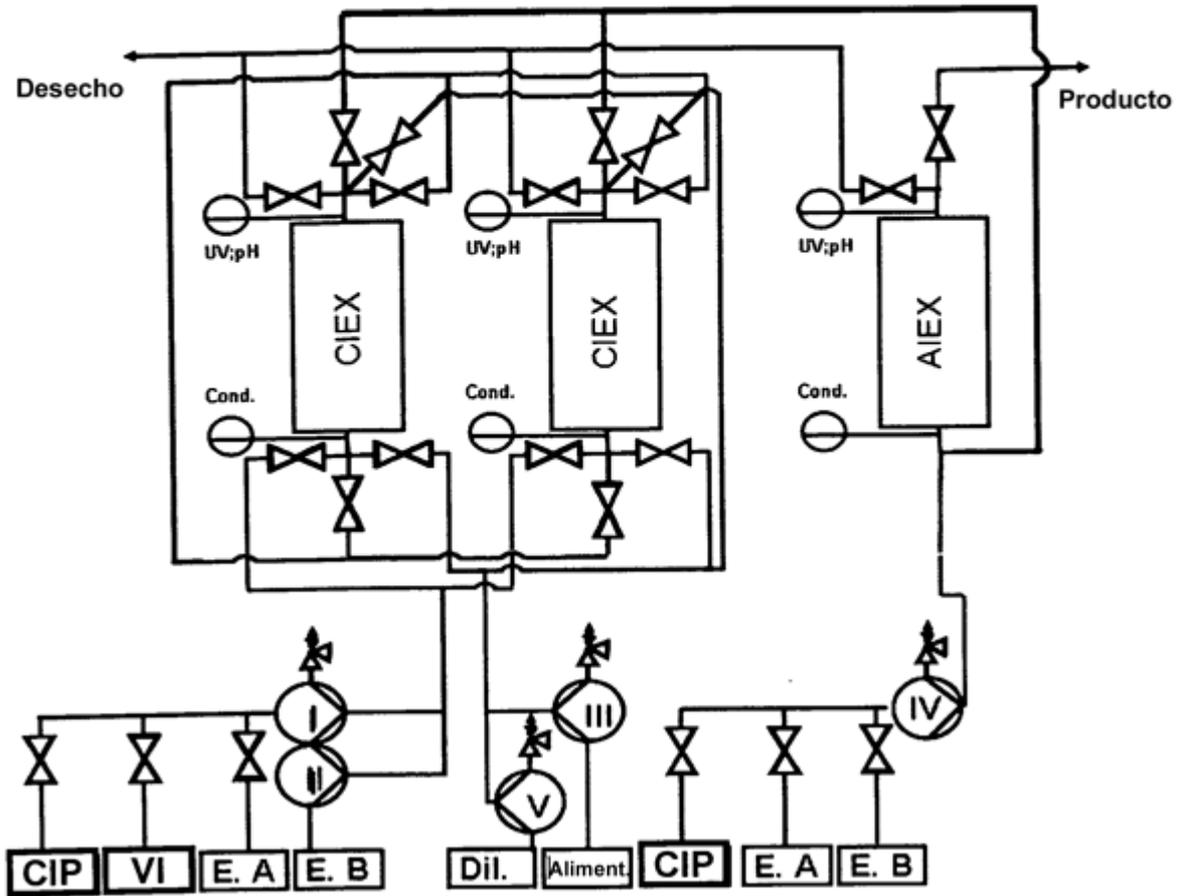


Fig. 2

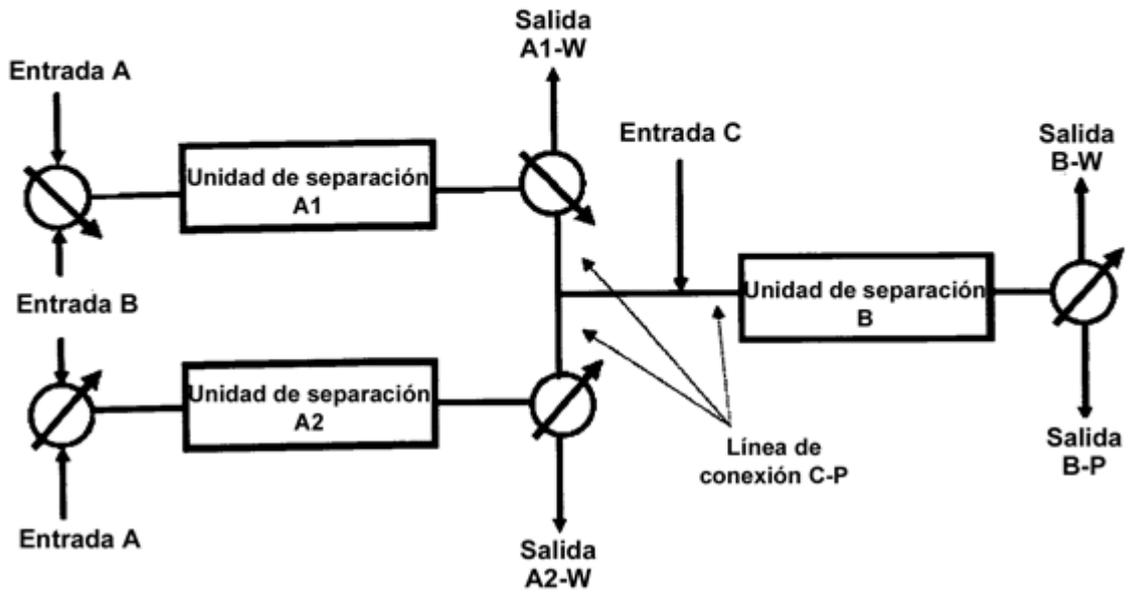


Fig. 3

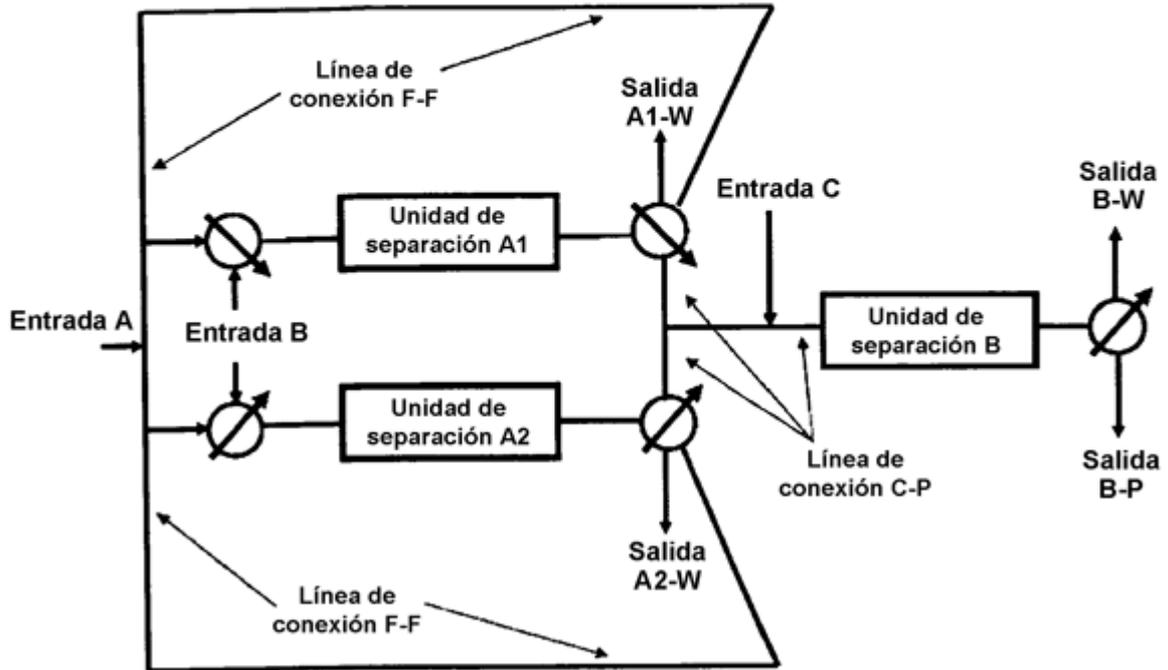


Fig. 4

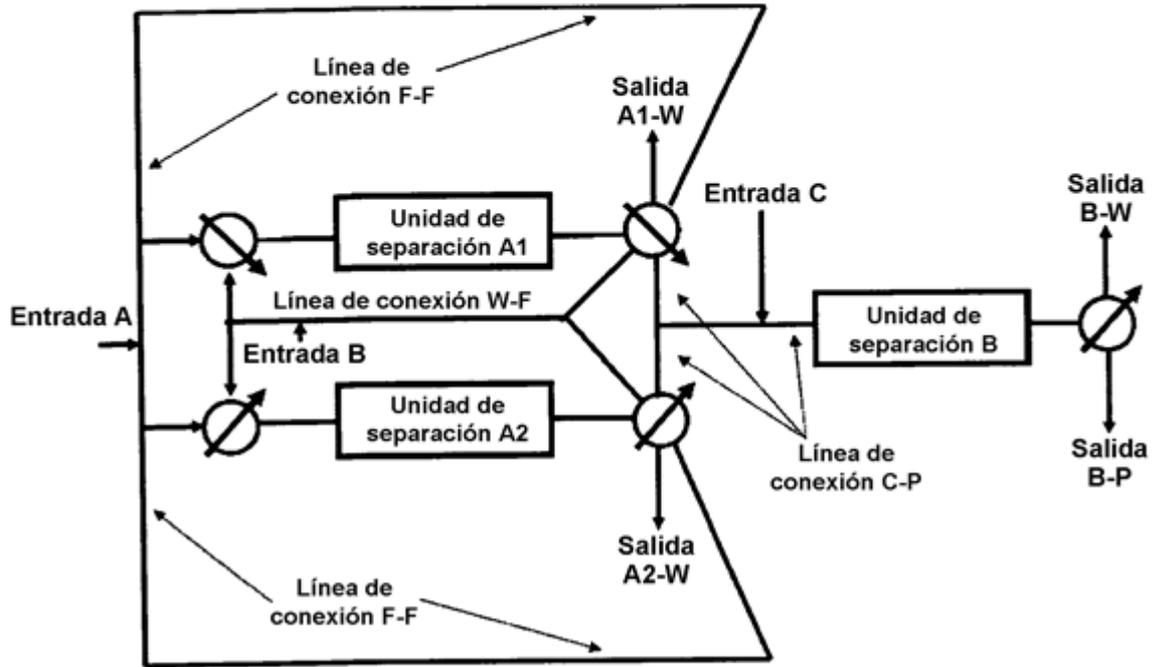


Fig. 5

