

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 828**

51 Int. Cl.:

B01F 27/13	(2012.01)
B01J 19/00	(2006.01)
B01J 19/26	(2006.01)
B01J 20/32	(2006.01)
B29B 9/16	(2006.01)
B01J 4/00	(2006.01)
B01J 19/18	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2018 PCT/US2018/044324**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019 WO19027876**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2018 E 18842194 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023 EP 3661636**

54 Título: **Aparato y métodos de acoplamiento de anticuerpo-resina**

30 Prioridad:

04.08.2017 US 201762541601 P

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

14.05.2024

73 Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED
(100.0%)
1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku,
Osaka-shi, Osaka, JP**

72 Inventor/es:

**TOSO, ROBERT;
SPANGGORD, RICHARD;
TAN, MEI;
TAIARIOL, VAN y
LIN, YEKATERINA**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 968 828 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

Aparato y métodos de acoplamiento de anticuerpo-resina

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a dispositivos para activar resinas y acoplar anticuerpos a la resina.

Antecedentes

10 La hemofilia es un trastorno hemorrágico hereditario que impide que la sangre coagule normalmente y se caracteriza por hemorragias, que pueden ocurrir espontáneamente o después de un traumatismo menor. A menudo está asociada con una deficiencia de una proteína esencial para la coagulación sanguínea, el factor VIII, también conocido como factor antihemofílico (AHF, por sus siglas en inglés). En humanos, el factor VIII está codificado por el gen F8. Los defectos en este gen dan como resultado hemofilia A (hemofilia “clásica”), un trastorno de coagulación recesivo ligado al cromosoma X que da como resultado un tiempo de coagulación en plasma prolongado. Otro tipo de hemofilia es la hemofilia A adquirida (AHA, por sus siglas en inglés), que se produce en pacientes que tienen genes F8 normales, pero desarrollan autoanticuerpos que inhiben el factor VIII, creando una deficiencia funcional que impide la coagulación.

20 Proporcionar factor VIII intravenoso a pacientes con hemofilia puede mejorar temporalmente la coagulación. Muchos tratamientos para la hemofilia, tales como los tratamientos para la hemofilia vendidos bajo las marcas comerciales RECOMBINATE, ADVATE, ADYNOVATE, HEMOFIL, y OBIZUR, disponibles de Shire Pic (Lexington, MA), comprenden proteínas del factor VIII recombinante sintetizadas y purificadas en el laboratorio.

25 Sin embargo, un factor limitante principal en la producción de dichos tratamientos es la capacidad para aislar y purificar las moléculas de factor VIII. Un método consiste en usar anticuerpos de factor VIII para capturar las moléculas en una columna. Los anticuerpos se acoplan a una resina y se cargan en una columna, y el medio que contiene las moléculas de factor VIII expresadas se hace pasar a través de la misma.

30 Este proceso de purificación requiere alta precisión para manipular adecuadamente la resina. Puede ser extremadamente costoso de realizar, porque la resina es costosa y puede dañarse o desperdiciarse fácilmente si no se procesa correctamente. Cuando la resina no se acopla adecuadamente a los anticuerpos, puede producirse reticulación entre perlas de resina. Las perlas también pueden romperse si la resina no se maneja cuidadosamente. Las perlas de resina rotas o reticuladas pueden obstruir la columna, creando una contrapresión excesiva y haciendo que el proceso de extracción falle. Por consiguiente, las dificultades con los procedimientos de manipulación de resina y las limitaciones de la tecnología de acoplamiento resina-anticuerpo hacen que el proceso de fabricación de fármacos para la hemofilia sea caro y complicado.

El documento WO 2015/153192 se refiere a un rociador de alimentación para un reactor de amoxidación.

40 **Resumen**

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

45 El aparato descrito en la presente memoria activa eficientemente perlas de resina y las acopla a anticuerpos, al tiempo que evita la ruptura y reticulación de las perlas, mejorando así los procesos de purificación de columna aguas abajo, prolongando la vida útil de las perlas de resina, y aumentando la eficiencia de captura de moléculas de los complejos de resina-anticuerpo resultantes, para permitir un mejor aislamiento y purificación de una amplia variedad de compuestos biológicos, incluyendo moléculas de factor VIII.

50 Aunque el aparato se describe generalmente en la presente memoria con referencia a su uso en la purificación de FVIII, debe entenderse que el aparato y los métodos relacionados son útiles para acoplar anticuerpos de todos los tipos a resinas porosas. Las invenciones de la presente divulgación pueden aplicarse a otras resinas de afinidad, en particular para otros productos de terapia de sustitución enzimática o cualquier otro fármaco o biomolécula de interés. Es aplicable a las químicas de reticulación entre ligandos que contienen proteína o amina y un soporte de resina. La resina puede ser agarosa, vidrio u otras resinas porosas conocidas de diversas densidades. Los anticuerpos utilizados pueden ser policlonales o monoclonales. Aunque el dispositivo se describe principalmente en la presente memoria como útil para acoplar anticuerpos a la resina, pero la invención es compatible con cualquier química en la que los grupos hidroxilo se acoplan a grupos amino. Debe entenderse que la invención es útil con cualquier anticuerpo conocido que pueda usarse para la purificación por cromatografía de afinidad de cualquier compuesto biológico, incluyendo péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y cualquier ligando con grupos amino.

65 El aparato es generalmente un dispositivo de mezcla, que incluye un recipiente con entradas para introducir perlas de resina y varios fluidos, un tubo de dispersión para la aplicación precisa de la solución de activación, un tamiz de malla para soportar las perlas de resina y permitir que los fluidos fluyan a través del mismo, un agitador para mezclar las perlas a medida que los fluidos fluyen a través del mismo, y salidas debajo del tamiz para drenar fluidos. Los componentes del aparato pueden estar hechos de acero inoxidable u otro material elástico. En funcionamiento, se

vierten perlas de resina en una solución tampón en el recipiente antes de ser activadas mediante dispersión de CNBr y acetonitrilo a través del tubo de dispersión. Las perlas se agitan usando el agitador durante un corto periodo de tiempo (aproximadamente 3 minutos o menos), antes de que el fluido se drene a través de la salida. Las perlas pueden lavarse con agua u otros tampones antes de agregar una solución de acoplamiento y anticuerpos monoclonales. Las perlas y los anticuerpos se incuban con agitación durante un período de tiempo establecido, mientras que el dispositivo mantiene una temperatura baja y monitoriza el pH de la solución. La resina acoplada a anticuerpo se captura en el tamiz y se retira del dispositivo para su uso. El dispositivo se puede utilizar para una variedad de tipos de resina y anticuerpo. El sistema permite activar grandes volúmenes de resina de manera rápida y uniforme, sin romper las perlas de resina y evitando la reticulación entre perlas. Esto proporciona un acoplamiento de resina-anticuerpo más eficaz mientras que controla la química para alargar la vida útil de las perlas de resina.

Un aspecto clave del dispositivo es el tubo de dispersión, que está optimizado para la dispersión de una solución de activación de CNBr a la resina. Esto permite una distribución uniforme de CNBr bajo un periodo de tiempo controlado y ayuda a conseguir la adición de la solución de activación rápidamente, preferiblemente en menos de aproximadamente 3 minutos. Estos factores son importantes para el acoplamiento homogéneo de los anticuerpos y la resina porque reducen la variación en la adición de solución a la mezcla de resina/tampón, que puede superar transitoriamente la capacidad tampón del tampón. Dicha variabilidad daría como resultado una reticulación no deseada de iso-urea que hidrolizaría y aumentaría la lixiviación de anticuerpos o potencialmente el intercambio con otros nucleófilos para ensuciar la resina o provocar un aumento de la lixiviación. Controlar el tiempo de la solución de activación ayuda con el control del proceso aguas abajo para el acoplamiento de anticuerpos, porque permite la activación óptima de la resina seguida por la rápida adición del anticuerpo antes de la pérdida de cantidades significativas de grupos activados en la resina.

En ciertos aspectos, la divulgación se refiere a un dispositivo para acoplar anticuerpos a resina. El dispositivo incluye un recipiente de mezcla dividido en una parte superior y una parte inferior por un tamiz de malla que se extiende a través del recipiente, teniendo la parte superior al menos una entrada y teniendo la parte inferior al menos una salida, y teniendo el tamiz de malla un tamaño de poro entre 5 y 80 μm . El dispositivo incluye además un agitador dispuesto dentro de la parte superior y un aparato de dispersión por encima del agitador. El aparato de dispersión incluye una estructura tubular alargada que forma un lumen. La estructura tubular tiene una parte proximal que se extiende verticalmente fuera del recipiente de mezcla con una entrada que se abre hacia arriba, una parte distal con un extremo cerrado y una pluralidad de orificios orientados hacia abajo dispuestos horizontalmente dentro de la parte superior, y un codo que conecta la parte distal y la parte proximal.

El agitador puede incluir un rotor y un impulsor giratorio que comprende un cubo y al menos dos palas que se extienden en direcciones opuestas perpendicularmente desde el cubo. Cada pala tiene un eje aproximadamente transversal al eje del rotor sobre el que el cubo está configurado para girar. El agitador está configurado para girar para impartir una fuerza sobre un fluido en el recipiente para proporcionar elevación y para mantener las perlas moviéndose a través del tamiz. El tamiz también puede tener una barra de soporte configurada para soportar el tamiz y evitar que el tamiz se curve. El tamiz puede estar configurado para poder retirarlo del recipiente.

El agitador gira a una velocidad suficiente para mezclar rápidamente perlas de resina sin romperlas. La velocidad de rotación del agitador puede estar entre aproximadamente 10 y 50 RPM, y en realizaciones particulares la velocidad es de 20 o 35 RPM. En realizaciones, las palas tienen un paso fijo y bordes redondeados.

En aspectos relacionados, la divulgación se refiere a un aparato de tubo de dispersión que incluye una estructura tubular alargada que forma un lumen con una sección circular. La estructura tubular incluye una parte proximal con una entrada orientada hacia arriba, una parte distal con un extremo cerrado y entre 4 y 100 y preferiblemente alrededor de 8 a 30 orificios orientados hacia abajo dispuestos en dos o más filas paralelas al eje de la parte distal. Las filas están dispuestas entre aproximadamente 15 y aproximadamente 60 grados de separación entre sí en la parte distal. La estructura tubular también incluye un codo entre la parte distal y la parte proximal, que comprende una curvatura en la estructura tubular para orientar la entrada de manera que se abra en una dirección que es sustancialmente perpendicular al eje de la parte distal.

En algunas realizaciones, la parte distal del aparato de dispersión tiene tres filas paralelas de orificios orientados hacia abajo. En algunas realizaciones hay entre 12 y 25 orificios orientados hacia abajo, y en una realización preferida hay 21 orificios, con filas de 10, 8 y 3 orificios. En algunas realizaciones, las filas tienen diferentes cantidades de orificios, y en otras tienen la misma cantidad de orificios. Las filas de orificios pueden estar dispuestas con una separación entre aproximadamente 15 y 105 grados. La curvatura en la parte de codo orienta la parte distal y la parte proximal entre 60 y 120 grados respectivamente entre sí, y en algunas realizaciones aproximadamente 80-100 grados, y en una realización preferida aproximadamente 90 grados. La estructura tubular puede ser de acero inoxidable. El aparato de dispersión también puede incluir una válvula para abrir y cerrar la entrada y un embudo conectable a la entrada, para retener el fluido de dispersión antes de su uso.

En un aspecto relacionado, la divulgación se refiere a métodos para activar una resina. El método implica insertar perlas de resina, suspendidas en agua, en un recipiente de mezcla, en donde el recipiente de mezcla incluye un aparato de dispersión, un tamiz de malla con orificios más pequeños que las perlas de resina, y un agitador dispuesto por encima del tamiz de malla. Las perlas de resina pueden comprender agarosa, tal como perlas de CL-4B o CL-2B o las perlas de agarosa vendidas bajo la marca comercial CAPTO por GE Healthcare Life Sciences (Marlborough, MA). El método incluye además dispersar una solución de activación que comprende CNBr y acetonitrilo sobre las perlas de resina a través del

aparato de dispersión y agitar el agitador durante menos de 5 minutos. El método implica después drenar la solución de activación a través del tamiz de malla, dejando así perlas de resina activada soportadas sobre el tamiz.

5 En algunas realizaciones, el método también implica lavar las perlas de resina activada con un fluido. El lavado puede incluir llenar el recipiente de mezcla con el fluido, incubar mientras se agita el agitador, y drenar el fluido del recipiente de mezcla. El fluido puede ser un tampón, agua o una solución que comprende bicarbonato de sodio y cloruro de sodio. La agitación puede estar entre 10 RPM y 40 RPM, y de forma preferible aproximadamente 20 RPM o 35 RPM. La incubación con agitación puede durar menos de 4 minutos, y preferiblemente menos de 3 minutos.

10 Breve descripción de los dibujos

Las FIGS. 1A-C muestran vistas del recipiente de mezcla. La FIG. 1A muestra una vista en sección lateral; la FIG. 1B muestra una vista en sección superior; y la FIG. 1C muestra una vista en sección frontal.

15 Las FIGS. 2A-G muestran el tubo de dispersión y una disposición preferida de orificios para el tubo de dispersión. La FIG. 2A muestra una vista lateral del tubo de dispersión. La FIG. 2B muestra una vista lateral del tubo de dispersión con una configuración particular de orificios. La FIG. 2C muestra una sección radial del tubo de dispersión, que muestra el ángulo en el que se perforan los orificios. La FIG. 2D muestra una vista lateral del tubo de dispersión con las ubicaciones de una fila de 8 orificios. La FIG. 2E muestra una sección radial del tubo de dispersión, que muestra el ángulo en el que se perforan los orificios de la FIG. 2D. La FIG. 2F muestra una vista lateral del tubo de dispersión con las ubicaciones de una fila de 10 orificios. La FIG. 2G muestra una sección radial del tubo de dispersión, que muestra el ángulo en el que se perforan los orificios de la FIG. 2F.

25 La FIG. 3 muestra el recipiente o embudo de retención desmontable para la solución de activación, y una válvula que conecta el embudo al tubo de dispersión.

Las FIGS. 4A-C muestran vistas del agitador. La FIG. 4A es una vista en sección lateral del agitador. La FIG. 4B es una vista en perspectiva invertida del agitador y las palas. La FIG. 4C es una vista en primer plano del cubo y la pala de la FIG. 4B.

30 Descripción detallada

Los dispositivos para aislar y purificar moléculas de medios de cultivo son fundamentales para la fabricación de fármacos. Muchos fármacos implican proteínas recombinantes que se desarrollan en cultivo y que luego deben purificarse y extraerse del medio. La purificación de estos compuestos requiere un control preciso de los reactivos y materiales, y un equipo especializado. Debido a la complejidad de preparar y usar estos materiales, se necesitan dispositivos para generar matrices de purificación para extraer los fármacos de una manera más eficiente, precisa y rentable. Dichos dispositivos mejoran la disponibilidad de proteínas recombinantes, que son necesarias para tratar una variedad de enfermedades.

40 Muchos fármacos implican proteínas recombinantes que proporcionan una respuesta bioquímica deseada cuando se introducen en un paciente. Por ejemplo, los fármacos para la hemofilia tales como RECOMBIMATE™ y ADVATE® son moléculas de factor VIII inyectables por vía intravenosa, que mejoran la coagulación de la sangre en pacientes con hemofilia para controlar y prevenir episodios hemorrágicos. El tratamiento con estos fármacos normaliza el tiempo de coagulación durante el período de dosificación eficaz, aumentando los niveles plasmáticos de factor VIII para corregir temporalmente el defecto de coagulación en esos pacientes. Los fármacos de sustitución del factor VIII se pueden usar para la prevención y reducción rutinarias de hemorragias, o se pueden administrar antes, durante y después de la cirugía para controlar la coagulación de la sangre. El objetivo de dichos tratamientos consiste en mantener un nivel de actividad del factor VIII plasmático en o por encima de los niveles deseados. Por ejemplo, para episodios de sangrado menores tales como hemartrosis temprana, sangrado muscular leve o episodios de sangrado oral leve, puede ser deseable administrar una dosis para alcanzar aproximadamente el 20-40 % del nivel normal de factor VIII. Para el sangrado moderado, tal como sangrado muscular, sangrado en la cavidad oral, hemartrosis definitiva y traumatismo conocido, puede ser necesario el 30-60 % de la actividad normal del factor VIII. Para tratar una hemorragia mayor, tal como hemorragia gastrointestinal significativa, hemorragia intracraneal, intraabdominal o intratorácica, hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia en los espacios retrofaríngeo o retroperitoneal o vaina de iliopsoas, fracturas o traumatismo craneal, puede ser necesario un nivel de factor VIII del 60-100 %.

55 RECOMBIMATE™, ADVATE®, ADYNOVATE®, HEMOFIL®, y OBIZUR® son ejemplos de moléculas de factor VIII recombinante que se pueden usar para sustituir temporalmente el factor VIII que le falta al paciente para lograr la hemostasia. ADVATE®, por ejemplo, es una glicoproteína purificada que consiste en 2.332 aminoácidos sintetizados por una línea celular de ovario de hámster chino modificada por ingeniería genética. ADYNOVATE® es la molécula de ADVATE® purificada que se ha conjugado covalentemente con una o más moléculas de polietilenglicol, que reduce la unión al receptor de depuración del factor VIII fisiológico (LRP1) y muestra una semivida terminal extendida. OBIZUR® es un análogo recombinante del factor VIII porcino. El dominio B presente en el factor VIII porcino de origen natural se sustituye por un enlazador de veinticuatro aminoácidos. Una vez activado, el fármaco resultante tiene una actividad comparable a la del factor VIII humano endógeno.

65 Para fabricar estos fármacos y otros fármacos que comprenden proteínas recombinantes, las moléculas deben purificarse a partir de medios de cultivo. Generalmente, las líneas celulares recombinantes expresan la proteína de

factor VIII y la secretan en el medio de cultivo celular. La molécula se purifica después a partir del medio de cultivo. El proceso de purificación puede implicar introducir el medio en una o más columnas de cromatografía de inmunoafinidad en las que una matriz de purificación, preparada mediante inmovilización de un anticuerpo monoclonal en una resina, aísla selectivamente el factor VIII. El método también puede implicar una o más etapas de filtración. HEMOFIL[®], por ejemplo, es una proteína de factor VIII aislada de plasma humano agrupado mediante cromatografía de inmunoafinidad usando un anticuerpo monoclonal de ratón contra factor VIII, seguido por una etapa de cromatografía de intercambio iónico para purificación adicional.

Los anticuerpos monoclonales son particularmente útiles para capturar el factor VIII y otras moléculas diana. La matriz de purificación que purifica selectivamente la molécula diana se elabora acoplando anticuerpos a una resina. La preparación de la resina y el acoplamiento de los anticuerpos es difícil debido a ligeros cambios en la química que afectan el proceso de unión y la matriz de purificación resultante. Los dispositivos descritos en la presente memoria proporcionan una mejor unión de anticuerpos a perlas de resina. La química del proceso de acoplamiento de resina se controla para generar complejos de anticuerpo-resina con mayor eficacia y longevidad. Con una fabricación y un manejo adecuados, la resina puede durar varios años y ser reutilizada cientos de veces antes de tener que ser reemplazada. Debido a que las perlas de resina pueden costar decenas de miles de dólares por litro, es importante para los fabricantes tener un proceso fiable para producir complejos de anticuerpo-resina de larga duración sin desperdiciar innecesariamente cantidades de la resina.

Como se ha indicado más arriba, pequeñas aberraciones en la química pueden reducir la función del producto de resina. La resina debe prepararse rápidamente y con precisión para conseguir un producto homogéneo a gran escala. Los dispositivos descritos permiten una reacción homogénea rápida que es repetible y que da como resultado un producto estandarizado. Sin dichos dispositivos, el producto de resina resultante tendría microheterogeneidades que crean problemas de lixiviación en la resina. Si la resina no se activa homogéneamente, las perlas pueden reticularse entre sí, creando grumos en la resina. La aglomeración y heterogeneidad en la resina conduce a problemas de empaquetamiento en los protocolos de purificación aguas abajo. Por ejemplo, la resina que se aglutina entre sí puede ser menos permeable a los fluidos que pasan a través de ella, y provocar una acumulación de presión en la columna. La resina heterogénea puede conducir a una captura ineficaz de la molécula diana o simplemente puede ser inutilizable y tener que ser desechada.

Los dispositivos descritos también evitan la rotura excesiva de las perlas durante las etapas de procesamiento. Si se rompen más de aproximadamente el 2 por ciento de las perlas, la resina resultante sería demasiado densa y se sobrecomprimiría al cargarla en la columna. Por lo tanto, las perlas rotas provocan contrapresión en la columna. Si se rompe demasiada resina durante la fabricación, parte o toda la resina debería ser desechada, lo que llevaría a un desperdicio y gasto excesivos. Los dispositivos descritos en la presente memoria evitan ese problema y otros. Los dispositivos optimizan la preparación de resina para asegurar el empaquetamiento apropiado de resina en la columna aguas abajo.

Además de una mejor dinámica de fluido en la columna, hay beneficios adicionales para la resina de acoplamiento utilizando el aparato descrito. El aparato permite mayor reproducibilidad de resina que los dispositivos de la técnica anterior. La resina resultante es más uniforme en términos de densidad de ligando, reticulación de perlas e integridad de perlas. Esto proporciona mayor estabilidad, reducción de variación en el proceso de fabricación, y mayor rendimiento. El resultado es un producto con una vida útil más larga, que se puede usar para un mayor número de ciclos de producción sin lixiviación de anticuerpo/ligando y pérdida de capacidad de unión. Esto reduce el coste de producción de la enzima u otro producto biológico.

Los dispositivos se pueden usar para muchos tipos de química de acoplamiento. Para los anticuerpos, el acoplamiento a menudo está basado en amina. Los anticuerpos pueden tener 20-30 grupos amino y otros 20-30 grupos carboxilo. La tecnología de acoplamiento descrita en la presente memoria se puede utilizar para cualquier anticuerpo o incluso para acoplamiento de moléculas más pequeñas. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales se acoplan, y en otras realizaciones los anticuerpos policlonales se acoplan a resina. La tecnología también se puede utilizar para acoplar péptidos. En cualquier caso, el objetivo de la tecnología consiste en conseguir el acoplamiento homogéneo de una molécula (anticuerpo, péptido u otro) a perlas de resina. La unión homogénea de las moléculas a resina proporciona al producto resultante comportamientos de lixiviación predecibles y una posibilidad de uso más larga.

El dispositivo de acoplamiento mostrado en las figuras adjuntas activa rápida y eficazmente la resina y acopla anticuerpos, para reducir el desperdicio, mejorar la eficiencia de acoplamiento y la recuperación de fármacos. Como se ha descrito más arriba, el dispositivo generalmente incluye un recipiente de mezcla, un tubo de dispersión, y un agitador y tamiz.

Las FIGS. 1A-C muestran el aparato 100 de acoplamiento. La FIG. 1A muestra una vista en sección lateral; la FIG. 1B muestra una vista en sección superior; y la FIG. 1C muestra una vista en sección frontal. El aparato 100 incluye un recipiente 110 de mezcla, que aloja los otros elementos descritos más abajo y sirve como recipiente de mezcla para las diversas etapas de mezcla. El recipiente 110 tiene múltiples entradas 120 y salidas 130. En la parte superior del recipiente 110 hay una compuerta articulada 150 donde se pueden insertar las perlas de resina. Las perlas de resina pueden ser perlas de agarosa, tales como perlas CAPTO[™], CL-4B o CL-2B, disponibles en GE Healthcare Life Sciences (Marlborough, MA) y generalmente se insertan en el recipiente 110 en una suspensión acuosa. En el recipiente 110 se pueden activar a la vez hasta 50 litros de perlas de resina, y por regla general aproximadamente 22-39 litros. Una vez dentro del recipiente 110, las perlas son soportadas por un tamiz 310, que está hecho de un material de malla con orificios de aproximadamente 10-80 μm , que son lo suficientemente pequeños para evitar que las perlas de resina entren en la

parte inferior del recipiente 110. En una realización preferida, los orificios son de aproximadamente 30 µm. Durante el proceso de activación y acoplamiento, las perlas se mezclan mediante un agitador 410 (mostrado en las FIGS. 4A-C), que evita que las perlas se asienten en el tamiz y ayuda a mantener la homogeneidad.

5 El recipiente contiene un tubo 210 de dispersión, que se describe con mayor detalle en las FIGS. 2A-G, a través del cual se añade una solución de activación de CNBr y acetonitrilo a las perlas. El tubo 210 de dispersión está diseñado para distribuir uniformemente la solución de activación sobre las perlas mientras que el agitador 410 las mantiene en movimiento para evitar la aglomeración de resina. Como se describe más abajo, el agitador 410 gira a una velocidad que es suficiente para proporcionar elevación a las perlas y para mantenerlas en movimiento, pero
10 lo suficientemente suave para evitar la rotura de las perlas. Después de la activación, la solución de activación se puede drenar a través del pico 130 de drenaje, dejando las perlas activadas sobre el tamiz 310.

En el recipiente 110 se pueden insertar diversos fluidos y tampones a través del tubo 210 de dispersión, la entrada 120 o la compuerta 150, según se desee. Para el proceso de activación, el proceso de lavado y el proceso de acoplamiento se requieren diferentes soluciones. Un proceso de acoplamiento de resina ejemplar comienza con la resina que se vierte en el
15 recipiente 110 a través de la compuerta 150. La resina incluye perlas de resina en una suspensión de agua. Una solución de activación de CNBr y acetonitrilo se dispersa sobre la resina a través del tubo 210 de dispersión mientras el agitador 410 mezcla la resina, manteniendo las perlas en movimiento por encima del tamiz 310. Se puede usar una pequeña cantidad de acetonitrilo para seguir la solución de activación en el tubo de dispersión. Las perlas se pueden lavar con la solución de
20 activación durante hasta 5 minutos para activar la resina. Preferiblemente, la activación tiene lugar en menos de 3 minutos.

Se pueden añadir varios tampones y soluciones de acoplamiento, junto con anticuerpos suspendidos en una solución de acoplamiento para acoplarlos a las perlas. Con todas las etapas de lavado y acoplamiento, como durante la activación, el agitador gira para mantener un movimiento constante de las perlas, evitando que se adhieran al tamiz, y para distribuir
25 uniformemente los diversos fluidos y tampones y para asegurar que éstos entran en contacto con todas las superficies de las perlas. Las etapas de lavado y otras etapas de mezcla pueden ser continuas, con fluido que fluye continuamente hacia las entradas y fuera de las salidas, o el recipiente puede llenarse y la mezcla puede tener lugar durante un periodo de tiempo establecido, desde varios segundos, hasta minutos, o incluso múltiples horas. El recipiente 110 también contiene controles de temperatura de modo que el contenido puede incubarse a una temperatura deseada durante la
30 mezcla. El aparato 100 también puede incluir una o más sondas 190, tales como un medidor de temperatura y/o una sonda de pH para monitorizar las condiciones dentro del recipiente durante la operación.

El tamiz 310 está diseñado para ser desmontable y se mantiene en su lugar mediante una serie de abrazaderas 330. El recipiente 110 también incluye muñones 175 de manera que el aparato puede montarse sobre un pivote. Esto permite
35 que el aparato se incline de manera que un usuario pueda llenar el recipiente o verter líquidos fuera de él según sea necesario. La función de inclinación permite que la resina procesada sea vertida fuera de la compuerta en lugar de ser recogida manualmente, lo que evita tensión adicional en las perlas y el tamiz. Los muñones 175 pueden bloquearse en su lugar durante el uso de modo que permanezcan estacionarios durante la mezcla. Es importante que el tamiz 310 y el
40 agitador 410 permanezcan sustancialmente horizontales durante la mezcla para lograr el movimiento adecuado de las perlas en el recipiente y para asegurar que las perlas se exponen uniformemente a las diversas mezclas de fluido.

Las FIGS. 2A-G muestran el tubo 210 de dispersión. Como se muestra en la FIG. 2A, el tubo 210 de dispersión consiste generalmente en una tubería hueca con una parte horizontal 230 larga, una parte vertical 220 y un codo 240. La parte horizontal 230 es generalmente una longitud de tubo metálico salpicada con orificios a intervalos regulares o
45 semirregulares. La longitud de la parte horizontal 230 se extiende a través del recipiente. En la realización mostrada, el tubo 210 de dispersión tiene una pluralidad de orificios 231, cuyas posiciones están marcadas (en las FIGS. 2B, 2D y 2F) por su distancia a lo largo de la longitud del tubo 210. Los orificios 231 permiten que fluya una mezcla de activación de CNBr a través de los mismos. Juntos, proporcionan una distribución homogénea reproducible de la mezcla de activación sobre la resina de abajo. El tubo 210 de dispersión, particularmente en combinación con el
50 agitador 410, evita la inconsistencia en la distribución de CNBr y evita picos de pH localizados que pueden conducir a una química de acoplamiento incorrecta y a una mayor lixiviación del ligando.

La parte vertical 220 del tubo 210 de dispersión está configurada para extenderse fuera del recipiente 110 mientras que la parte horizontal 230 está situada dentro del recipiente 110 por encima del agitador 410 y el tamiz 310. La parte vertical 220 incluye una entrada 225, a través de la cual el CNBr puede fluir e introducirse en el recipiente 110
55 de mezcla. La parte horizontal 230 tiene un extremo cerrado 235 y una pluralidad de orificios 231. Aunque en las FIGS. 2B-G se muestra una posible disposición de orificios, también se contemplan otras disposiciones similares de orificios. Los orificios deben distribuirse a lo largo de la parte horizontal del tubo de dispersión para lograr una cobertura suficiente de la resina que se está mezclando abajo.

Las FIGS. 2B-C muestran las ubicaciones de tres orificios perforados a lo largo del borde inferior de la parte horizontal 230. La FIG. 2B muestra una sección radial del tubo de dispersión. Como se representa, los orificios están situados a 29,84 cm (11,75 pulgadas), 40,00 cm (15,75 pulgadas) y 67,31 cm (26,50 pulgadas) medido desde el eje 229 de la parte vertical 220. La FIG. 2C muestra una sección transversal de la parte horizontal. Como se
60 muestra en la FIG. 2C, los orificios se perforan a través del punto inferior en la parte horizontal.
65

Las FIGS. 2D-E muestran las ubicaciones de ocho orificios perforados en un ángulo de 45 grados desde el borde inferior de la parte horizontal 230. La FIG. 2D muestra una sección radial del tubo de dispersión, que muestra las mediciones de los orificios desde el eje 229 de la parte vertical 220. Como se representa, los orificios están situados a 7,62 cm (3,00 pulgadas), 10,16 cm (4,00 pulgadas), 15,24 cm (6,00 pulgadas), 20,32 cm (8,00 pulgadas), 49,53 cm (19,50 pulgadas), 54,61 cm (21,50 pulgadas), 59,69 cm (23,50 pulgadas) y 63,50 cm (25,00 pulgadas). La FIG. 2E muestra una sección transversal de la parte horizontal, que indica el ángulo en el que se perfora este conjunto de orificios.

Las FIGS. 2F-G muestran las ubicaciones de otros diez orificios perforados en un ángulo de 45 grados, en el otro lado del tubo 210 de dispersión desde el conjunto de ocho orificios (mostrado en la FIG. 2D). La FIG. 2F muestra una sección radial del tubo de dispersión, que muestra las mediciones de los orificios desde el eje 229 de la parte vertical 220. Como se representa, los orificios están situados a 6,35 cm (2,50 pulgadas), 8,89 cm (3,50 pulgadas), 11,43 cm (4,50 pulgadas), 16,51 cm (6,50 pulgadas), 24,13 cm (9,50 pulgadas), 29,21 cm (11,50 pulgadas), 53,34 cm (21,00 pulgadas), 58,42 cm (23,00 pulgadas), 60,96 cm (24,00 pulgadas), y 66,04 cm (26,00 pulgadas). La FIG. 2G muestra una sección transversal de la parte horizontal, que indica el ángulo en el que se perfora este conjunto de orificios.

Como se representa en las FIGS. 2B-G, los conjuntos de orificios están dispuestos en tres filas paralelas perforadas en la mitad inferior de la parte horizontal 230. Cada una de las tres filas tiene un número diferente de orificios 231, y cada orificio está perforado a una distancia a lo largo de la parte horizontal 230 que es diferente de la distancia de todos los otros orificios. La ubicación de los orificios es una consideración importante para asegurar una distribución uniforme de la solución de activación sobre la resina. Se ha comprobado que esta disposición de orificios es óptima basándose en experimentos de modelado de sales. Sin embargo, también se pueden usar otras disposiciones de orificios. El número preciso de orificios, su relación entre sí, el número de filas, el ángulo en el que se perforan los orificios, el tamaño de los orificios, y otros factores pueden ajustarse según sea necesario.

La adición de la mezcla de activación utilizando el tubo de dispersión es superior a la adición manual porque logra una mayor uniformidad en el producto de resina resultante. Como se ha explicado más arriba, la resina fabricada por el aparato de acoplamiento descrito funciona de manera diferente en la columna en comparación con la resina generada usando otros métodos. El uso del tubo de dispersión puede añadir cien o más ciclos a la vida útil de las perlas de resina.

Otra ventaja importante del tubo de dispersión consiste en que permite la distribución homogénea de la mezcla de activación en un período de tiempo muy corto. La activación de la resina con CNBr tiene que ocurrir rápidamente con el fin de reducir la aparición de reticulaciones. En la mayoría de los casos debe completarse en menos de 5 minutos, e idealmente debe completarse en menos de aproximadamente 3 minutos. Si el proceso de activación dura significativamente más de 3 minutos, la eficiencia de acoplamiento se reduce, dando como resultado una reticulación excesiva. El tubo de dispersión, particularmente junto con el sistema agitador descrito más abajo, permite que el proceso de activación tenga lugar rápidamente con el fin de producir una resina de alta calidad. El CNBr puede añadirse a hasta aproximadamente 40 litros de resina, mezclarse y retirarse en menos de 3 minutos, y en algunos casos en menos de 2 minutos.

La FIG. 3 muestra un recipiente o embudo 290 de retención desmontable para la solución de CNBr-acetonitrilo, que puede estar incluido en el aparato. La salida 291 del embudo 290 está en comunicación de fluido con la entrada 225 en la parte vertical 220 del tubo de dispersión. Una válvula 280 controla el flujo del fluido desde el embudo 290 al interior del tubo 210 de dispersión. En uso, el recipiente 290 de retención desmontable se llena con la solución de CNBr y se une al tubo de dispersión. La posibilidad de retirar el embudo 290 permite manejar el CNBr de manera más segura y evitar derrames. La mezcla de CNBr-acetonitrilo es corrosiva y peligrosa, y por lo tanto el embudo desmontable permite que la mezcla se mezcle bajo una campana antes de conectarse al aparato de acoplamiento.

Una vez que la resina se prepara para su activación, la válvula 280 se abre para permitir que la solución se desplace a través del tubo 210 de dispersión y sobre la resina. La dispersión tarda típicamente 2-4 minutos. La solución puede seguirse con un pequeño volumen de solución de acetonitrilo para enjuagar el CNBr restante fuera del embudo 290 y el tubo 210.

Dentro del recipiente 110, las perlas de resina se agitan mediante el agitador 410, que las mantiene moviéndose a través del tamiz 310. En la FIG. 4A se muestra una vista en sección lateral del agitador. El agitador incluye un rotor 420, que es una varilla vertical unida a un motor de agitación (no mostrado). El agitador también incluye palas 440 unidas a la varilla en un cubo 445. En la FIG. 4A se muestran las palas 440 en sección. En la FIG. 4B se muestra una vista en perspectiva invertida del agitador para proporcionar una vista más clara de la configuración de la pala 440. Las palas 440 giran para elevar las perlas de resina del tamiz 310. El agitador también puede incluir un marco circular 450 que circunscribe los puntos más externos de las palas 440, y puede incluir además radios 460 para un soporte adicional. Con referencia de nuevo a la FIG. 4A, el borde inferior del marco 450 está configurado para ser paralelo con el tamiz (no mostrado), que está dispuesto por debajo del agitador 410.

Las palas 440 mostradas en la FIG. 4A tienen una anchura de 7,62 cm (3,0 pulgadas), un grosor de 0,63 cm (0,25 pulgadas) y una longitud de 71,12 cm (28,0 pulgadas). Sin embargo, las dimensiones de las palas 440 pueden ser diferentes para usos diferentes. En algunas realizaciones, el agitador 410 puede incluir más de dos palas. Como se muestra, cada pala 440 tiene un paso de 40 grados con respecto a la horizontal. En diferentes realizaciones, las palas pueden tener diferentes ángulos de paso, tales como 10 grados, 20 grados, 30 grados, 50 grados, 60 grados, 70 grados, 80 grados, y similares. Las palas 440 pueden tener bordes redondeados 449 como se muestra en la FIG. 4C, lo que ayuda a evitar la rotura de las perlas. El

agitador puede estar hecho de acero inoxidable u otro material elástico. En la realización mostrada en las FIGS. 4A-C, el agitador está configurado para girar en el sentido de las agujas del reloj de modo que las palas crean una elevación ascendente en el fluido en el recipiente (en lugar de empujar el fluido hacia abajo en el tamiz).

- 5 La velocidad de rotación del agitador se puede ajustar en función del tipo de perlas de resina que se están utilizando y la cantidad de mezcla necesaria. El agitador debe proporcionar suficiente elevación para mantener las perlas suspendidas y en movimiento a través del tamiz, y para mezclarlas rápidamente mientras se evita romper o aplastar las perlas. Dado que las diferentes perlas se depositan a diferentes velocidades, la velocidad del agitador debe ser ajustable para tener en cuenta diferentes tipos de perlas. Por ejemplo, las perlas CAPTO™ se depositan más rápido que las perlas CL-4B o
- 10 CL-2B. En diversas realizaciones, el agitador puede girar hasta 60 RPM. Una velocidad de agitación preferida es de 35 RPM. Otra velocidad de agitación preferida es de 20 RPM. La velocidad puede determinarse en función del tipo de perla, el tipo de líquido, la temperatura del líquido y la duración del tiempo de incubación. Sobre la base de estos factores, el agitador está diseñado para mezclar la resina por completo durante el proceso de activación de la resina y durante el proceso de acoplamiento del anticuerpo. Esto permite una mezcla correcta para la dispersión química y evita el aplastamiento/rotura de las perlas de resina durante el proceso de acoplamiento. El agitador también aumenta la
- 15 velocidad de recuperación de la resina porque evita que la resina se pegue al tamiz.

- En algunas realizaciones, las dos palas 440 del agitador pueden estar en ángulo en direcciones opuestas para proporcionar una agitación y suspensión dinámica de la resina dentro de la solución en el interior del recipiente. En
- 20 otras palabras, una pala está inclinada hacia abajo haciendo que la resina sea empujada hacia abajo sobre el tamiz, mientras que la otra está inclinada hacia arriba para crear elevación. En otras realizaciones, las palas de agitador están en ángulo en la misma dirección. El agitador está configurado para crear un patrón de flujo que provoca la mezcla y suspensión adecuadas de la suspensión de resina cuando se gira el agitador.

- 25 En el proceso de activación de resina, mientras las perlas están en movimiento, el tubo 210 de dispersión descrito más arriba se puede utilizar para distribuir la mezcla de activación sobre las perlas. De acuerdo con varios métodos se pueden bombear tampones y otros fluidos a través del recipiente durante el proceso de activación, lavado y acoplamiento. Los fluidos pasan a través del tamiz y se drenan a través de una salida en el fondo del recipiente, mientras que el agitador 410 mantiene las perlas en movimiento por encima del tamiz.

- 30 El tamiz mostrado en las FIGS. 1A-C tiene un diámetro de 76,20 cm (30 pulgadas) con un tamaño de poro de malla de 30 µm para retener la resina y permitir que las diferentes soluciones y tampones se filtren a través de la malla durante el proceso de acoplamiento. La malla puede tener un tamaño de poro tan pequeño como aproximadamente 5 µm y hasta un máximo de aproximadamente 80 µm. En cualquier caso, el tamaño de poro debe ser lo suficientemente pequeño como para que las perlas no puedan pasar a través del tamiz. El tamiz puede ser un tamiz
- 35 de malla simple, o puede consistir en dos, tres o más capas sinterizadas. Topmesh TM3-BM 30 es una malla que es compatible con la presente invención, suministrada por G. BOPP USA, INC. (Wappingers Falls, NY).

- 40 En una realización, la capa superior es una malla de filtración de 30 µm, sinterizada con una malla cuadrada de 0,850 mm y una malla cuadrada de 2,0 mm para soporte. El tamiz está soldado a un marco de acero inoxidable de 76,20 cm (30 pulgadas). El tamiz puede mantenerse en su lugar dentro del recipiente mediante una junta, que puede ser desmontable del tamiz.

- 45 Como se ha explicado más arriba, el agitador está diseñado para mezclar suficientemente la resina mientras que evita que la resina se rompa, lo que obstruiría el tamiz e impediría una recuperación de resina eficiente. Sin embargo, el tamiz es desmontable, de modo que puede limpiarse o reemplazarse después de un desgaste normal. El proceso de activación de acoplamiento requiere intercambios de tampón rápidos, en el orden de minutos, donde la obstrucción del tamiz conducirá a tasas de intercambio de tampón más lentas, causando así faltas de conformidad del proceso y rechazo potencial del lote.

- 50 El tamiz es elástico y resistente al desgarro o rotura, para evitar que la resina escape a través del tamiz. Además, la estructura de tamiz es lo suficientemente fuerte como para no curvarse o doblarse bajo el peso de la resina. La curvatura conduciría a una mezcla no homogénea o a un flujo deficiente de tampón a través del aparato y podría provocar la obstrucción de la malla. La curvatura también podría bloquear la válvula 130 de salida para el recipiente 110 que está situado a una corta distancia por debajo del nivel del tamiz. En algunas realizaciones se puede situar una placa de soporte
- 55 perforada entre las capas para mayor rigidez y durabilidad. Adicional o alternativamente, el tamiz puede incluir una barra de soporte de acero inoxidable situada por debajo del tamiz para soportar el centro. La inclusión de estructuras de soporte ayuda a evitar la heterogeneidad en la distribución de las perlas a través del tamiz. Una distribución desigual conduciría a aglomeración de resina y cambios en la química y las propiedades de lixiviación de la resina.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato de dispersión para su uso en un aparato para acoplar anticuerpos a una resina, comprendiendo el aparato de dispersión:
5 una estructura tubular alargada que forma un lumen que tiene una sección circular, comprendiendo la estructura tubular: (a) una parte proximal con una entrada orientada hacia arriba; (b) una parte distal con un extremo cerrado, comprendiendo la parte distal una pluralidad de orificios orientados hacia abajo dispuestos en tres filas paralelas al eje de la parte distal y en donde las tres filas están situadas entre aproximadamente 15 y aproximadamente 60 grados entre sí en la parte distal; y (c) un codo entre la parte distal y la parte proximal, comprendiendo el codo una curvatura en la estructura tubular que orienta la entrada de manera que se abre en una dirección que es sustancialmente perpendicular desde el eje de la parte distal.
- 10 2. El aparato de dispersión de la reivindicación 1, en donde la parte distal comprende entre 8 y 30 orificios orientados hacia abajo.
- 15 3. El aparato de dispersión de la reivindicación 2, en donde la parte distal comprende exactamente 21 orificios orientados hacia abajo.
- 20 4. El aparato de dispersión de la reivindicación 3, en donde una primera de las tres filas tiene 10 orificios, una segunda de las tres filas tiene 8 orificios, y una tercera de las tres filas tiene 3 orificios.
5. El aparato de dispersión de la reivindicación 1, en donde las tres filas tienen diferentes números de orificios.
- 25 6. El aparato de dispersión de la reivindicación 1, en donde las tres filas tienen el mismo número de orificios.
7. El aparato de dispersión de la reivindicación 1, en donde las tres filas están situadas cada una entre 30 y 60 grados de separación.
- 30 8. El aparato de dispersión de la reivindicación 7, en donde cada una de las tres filas está situada con 45 grados de separación.
9. El aparato de dispersión de la reivindicación 1, en donde la curvatura en el codo orienta la parte distal y la parte proximal entre 60 y 120 grados entre sí.
- 35 10. El aparato de dispersión de la reivindicación 9, en donde la curvatura en el codo orienta la parte distal y la parte proximal entre 80 y 100 grados entre sí.
- 40 11. El aparato de dispersión de la reivindicación 10, en donde la curvatura en el codo orienta la parte distal y la parte proximal exactamente con 90 grados entre sí.
12. El aparato de dispersión de la reivindicación 1, en donde la estructura tubular comprende acero inoxidable.
- 45 13. El aparato de dispersión de la reivindicación 1, que comprende además una válvula para abrir y cerrar la entrada.
14. El aparato de dispersión de la reivindicación 1, que comprende además un embudo conectable a la entrada.

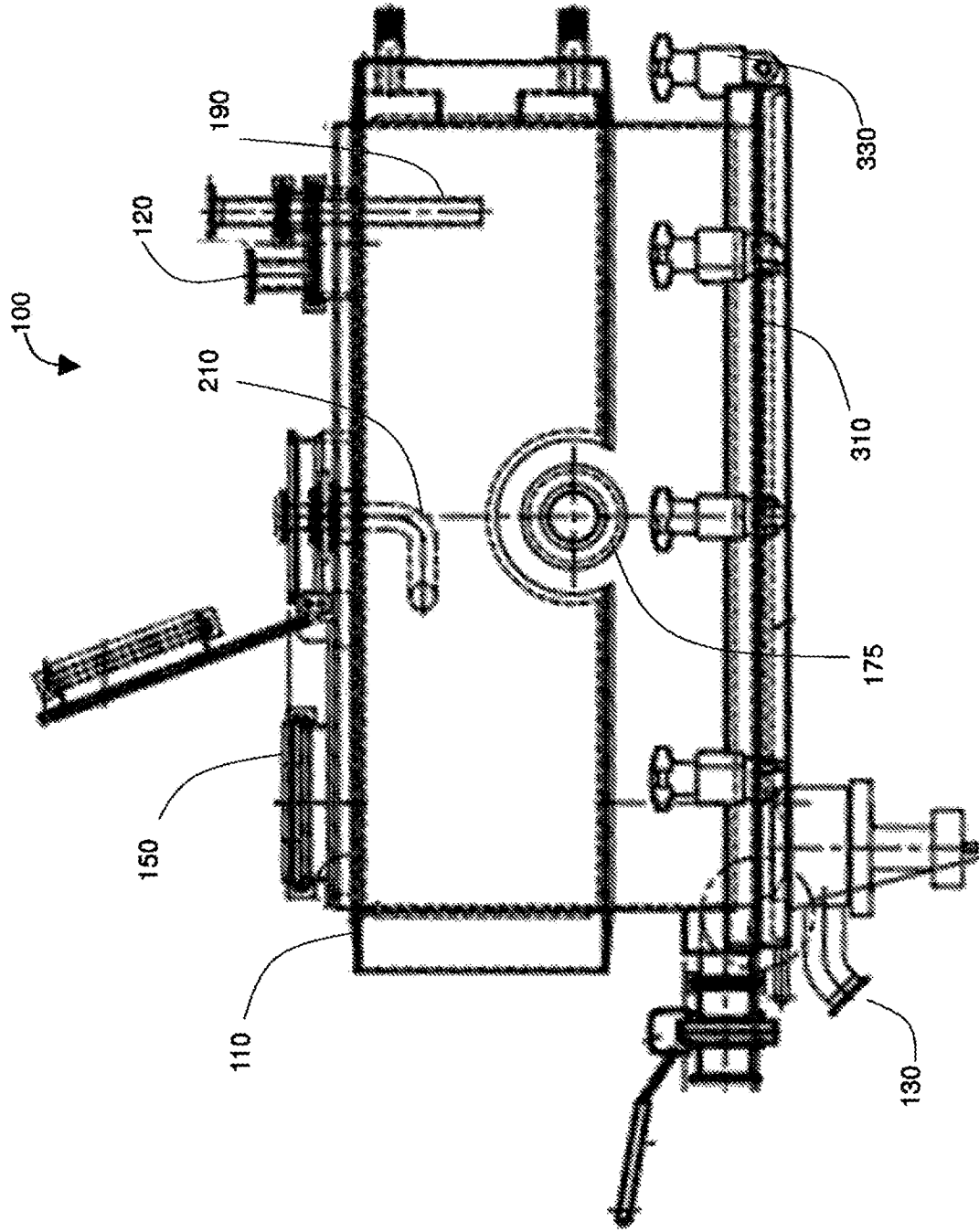


Figura 1A

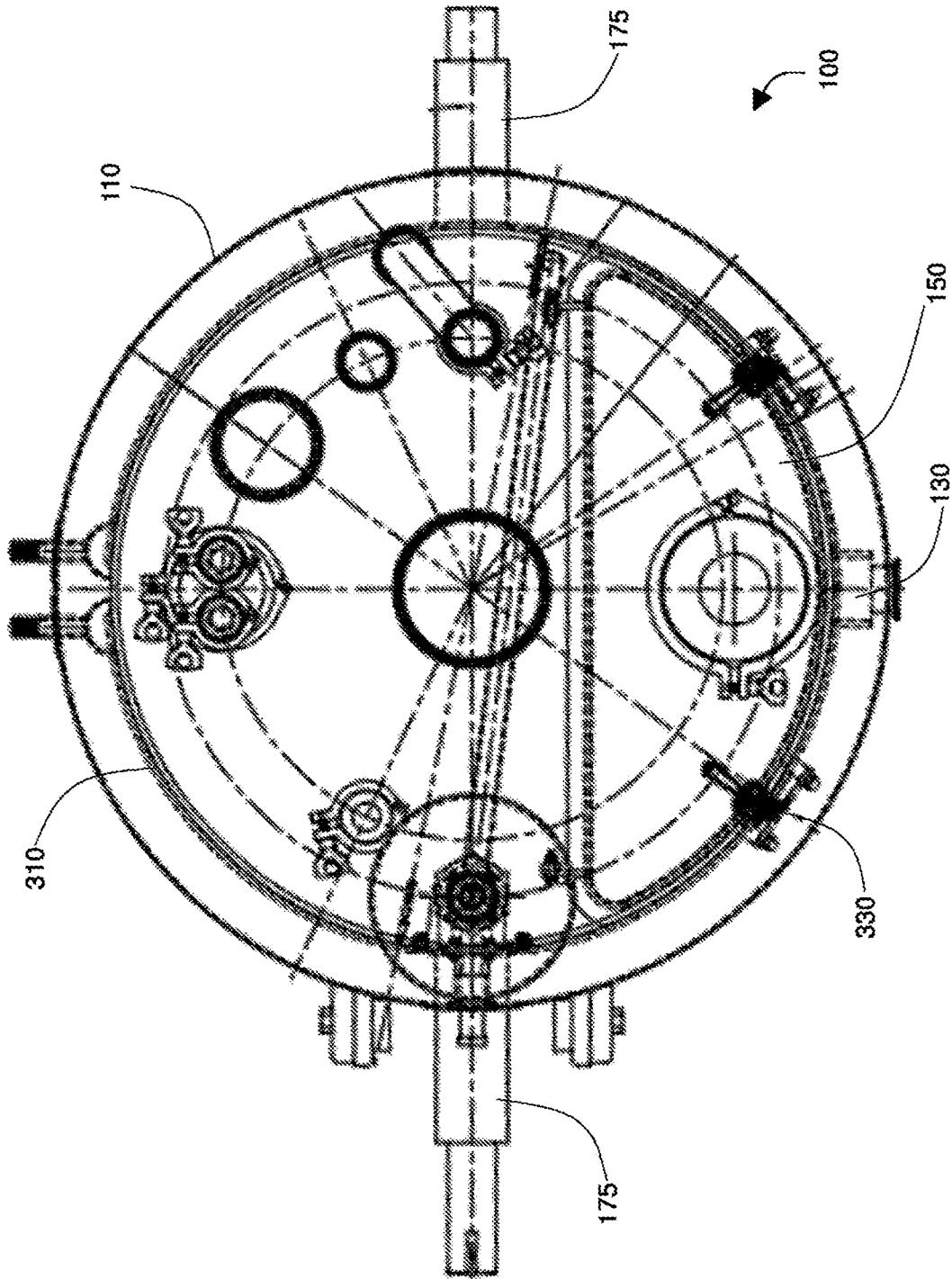


Figura 1B

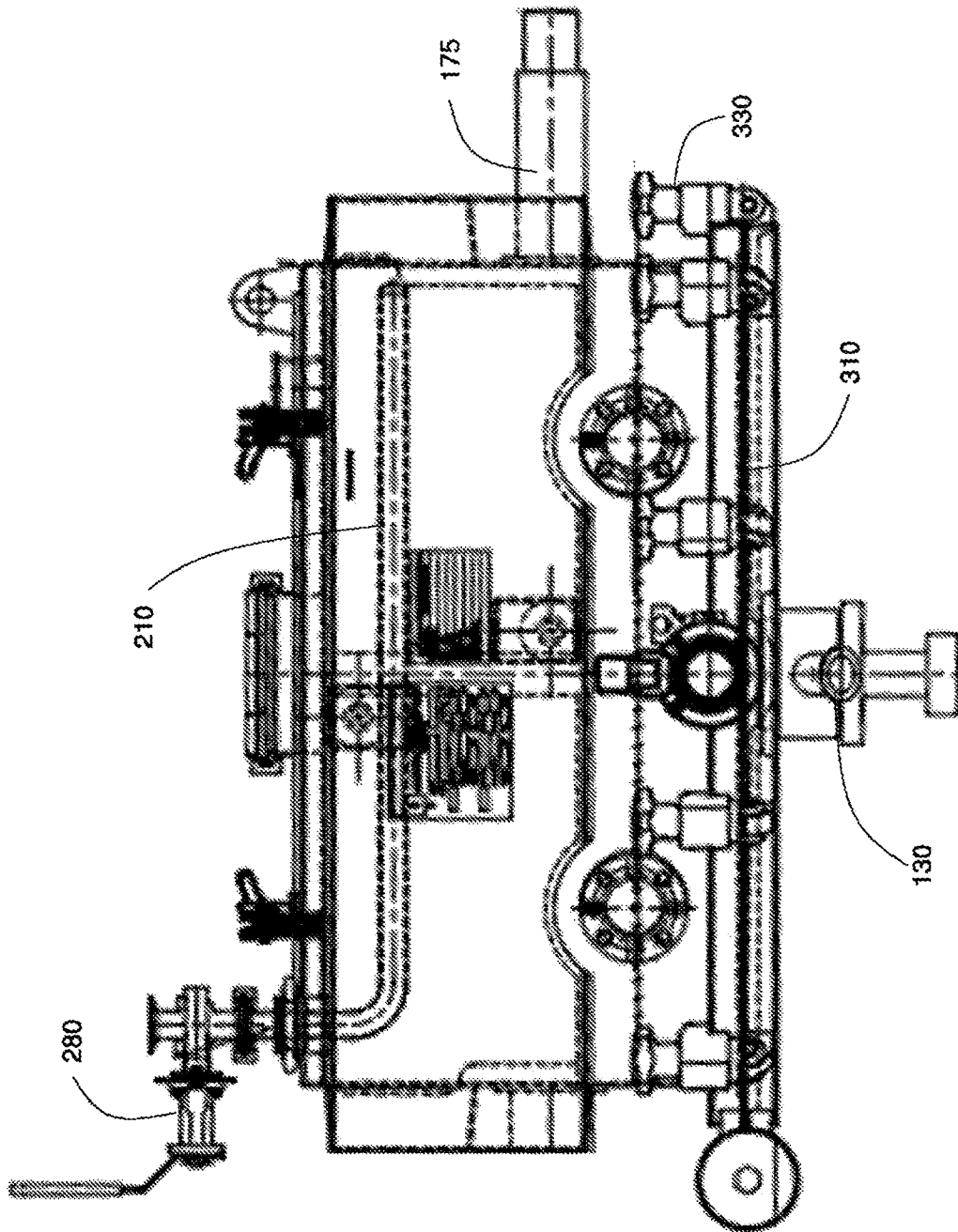


Figura 1C

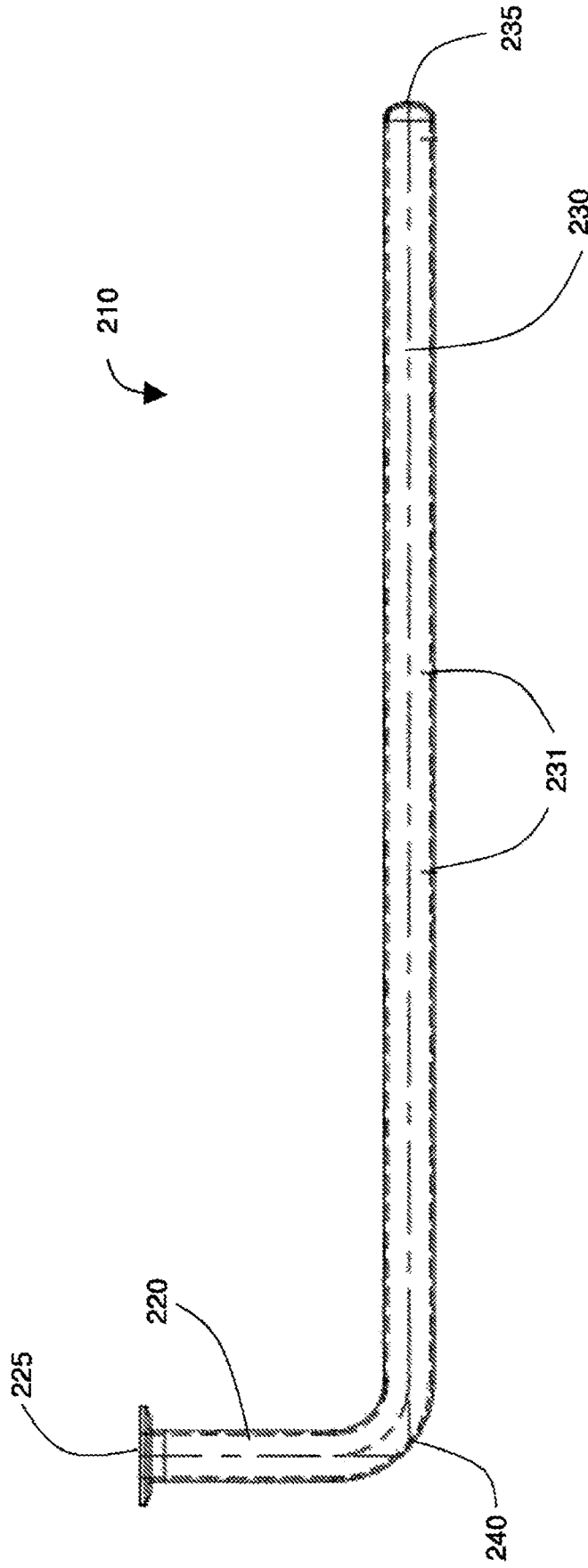


Figura 2A

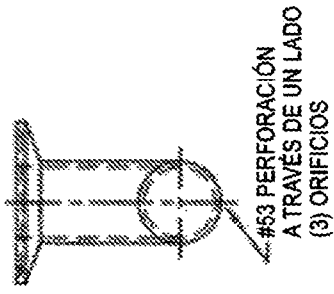


Figura 2C

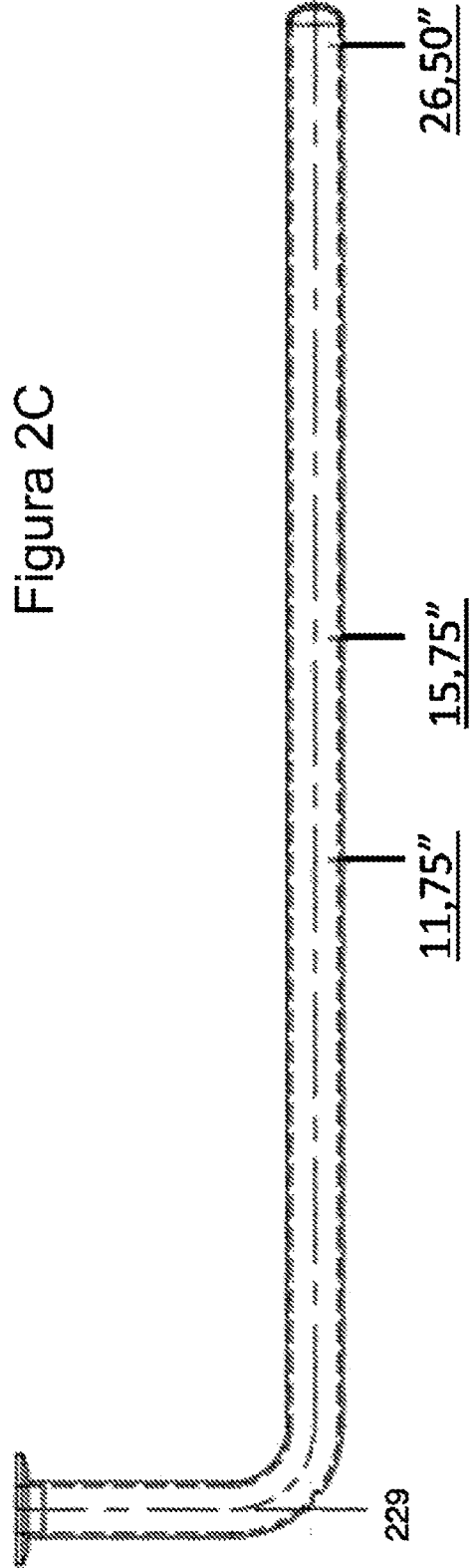


Figura 2B

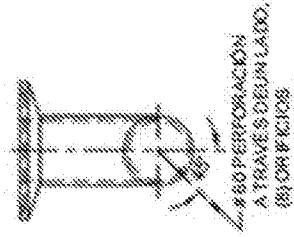


Figura 2E

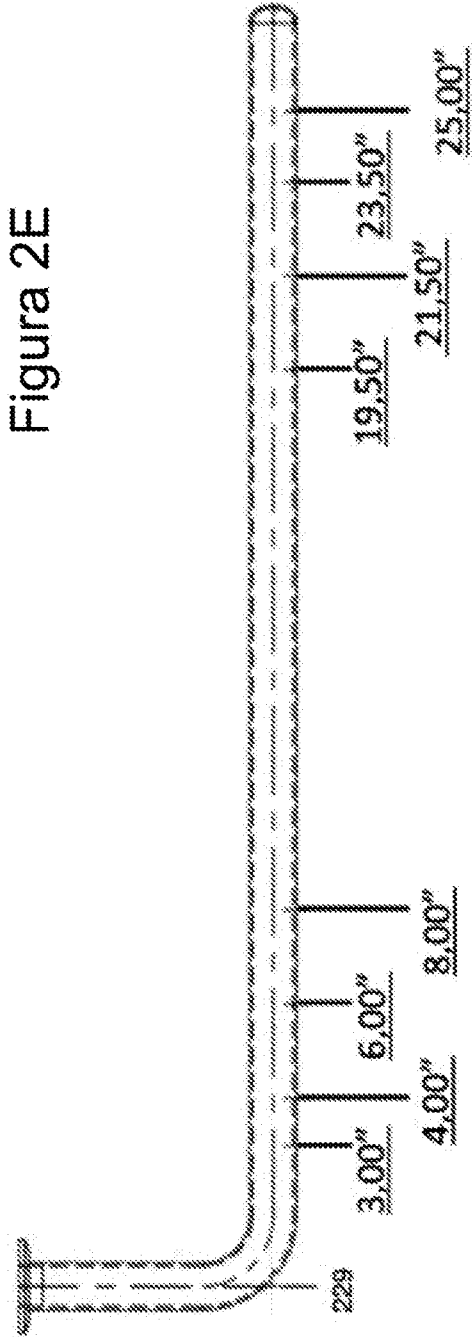


Figura 2D

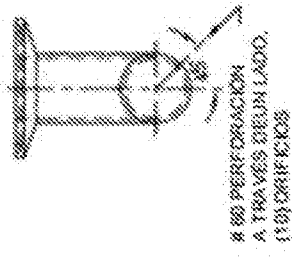


Figura 2G

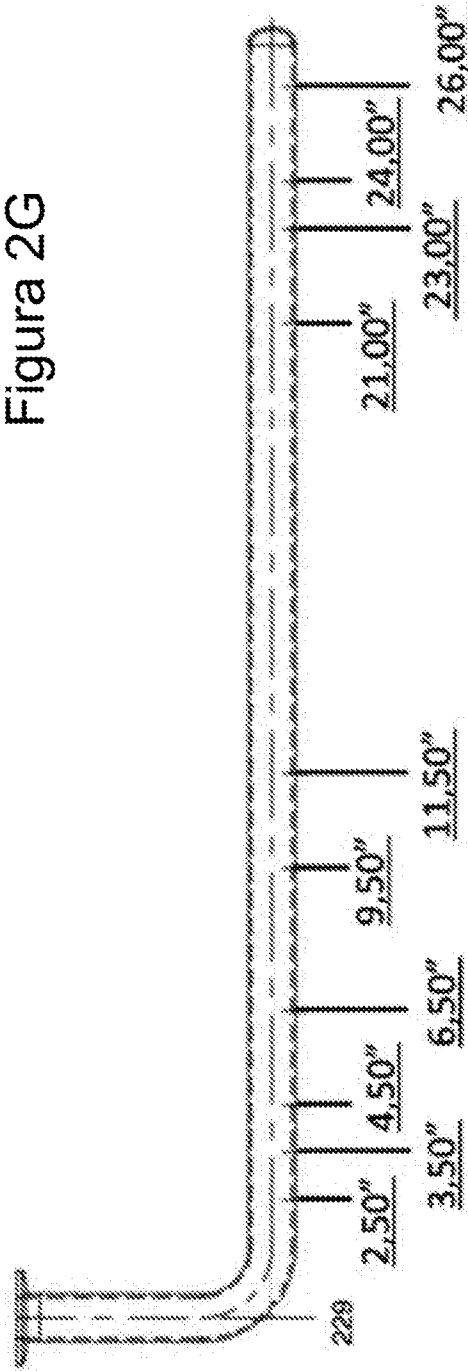


Figura 2F

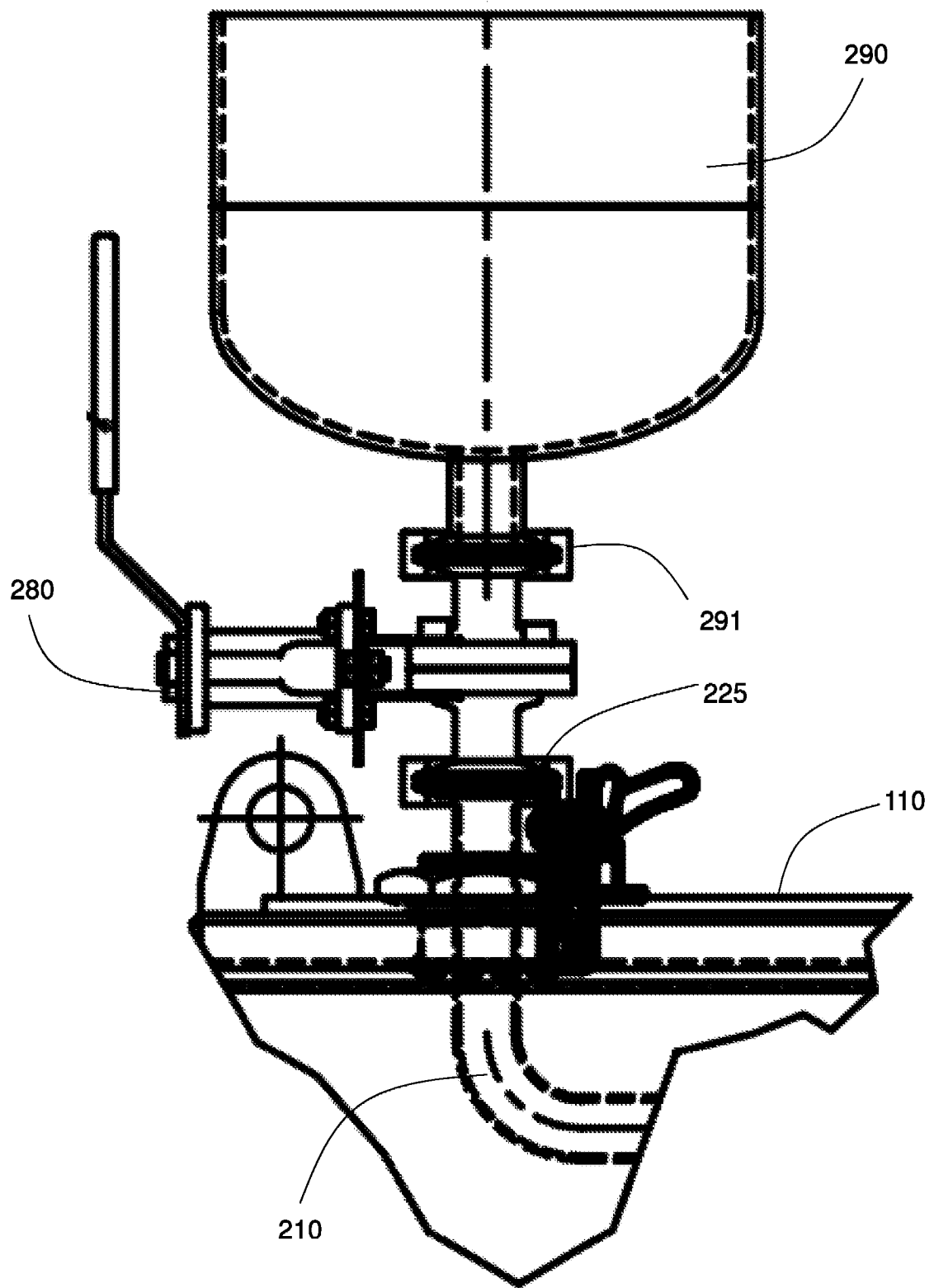


Figura 3

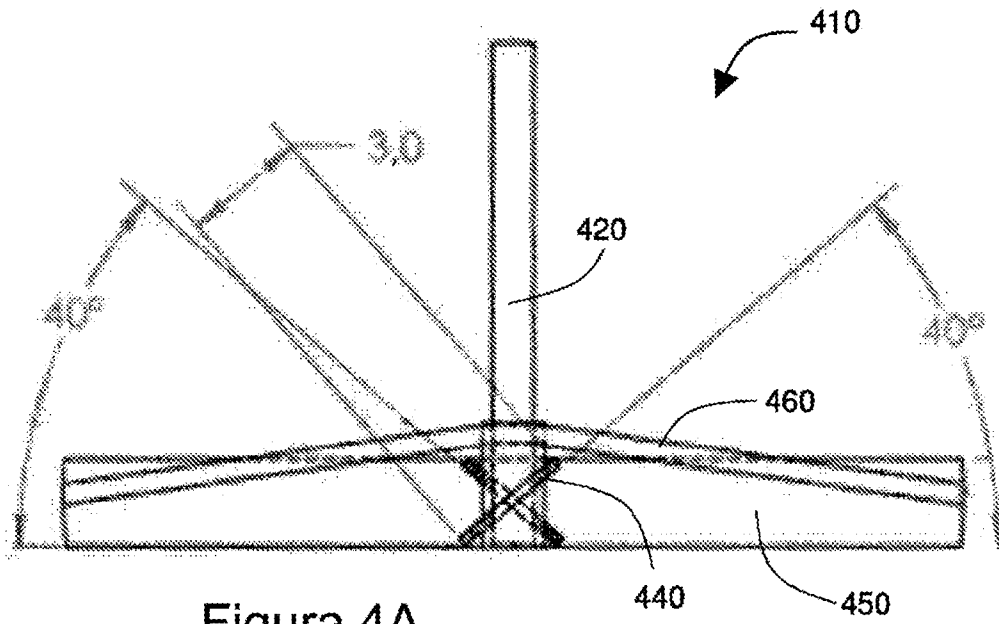


Figura 4A

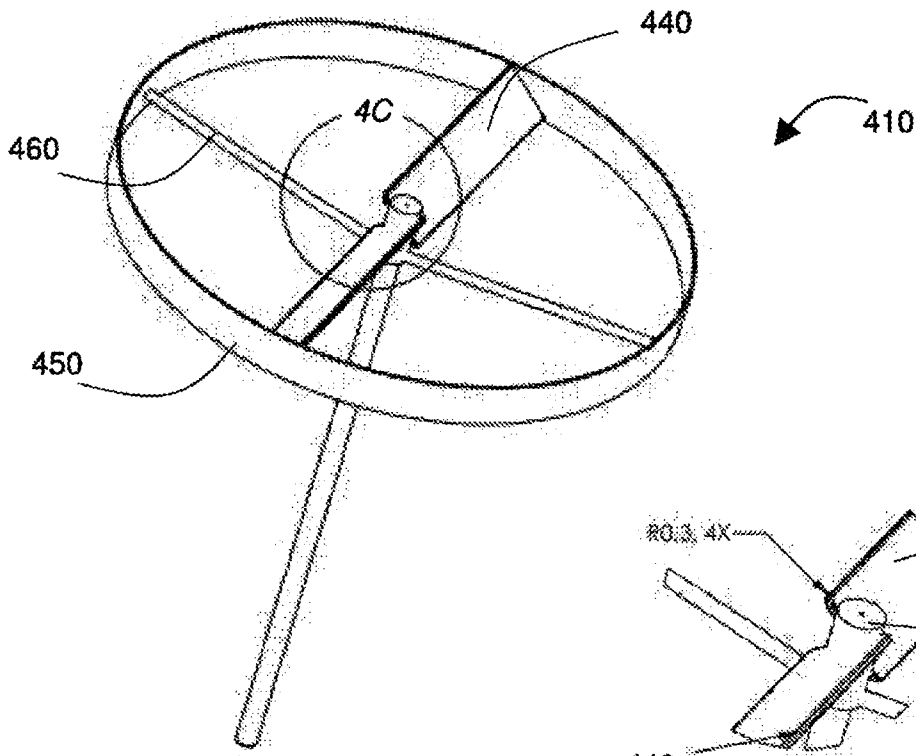


Figura 4B

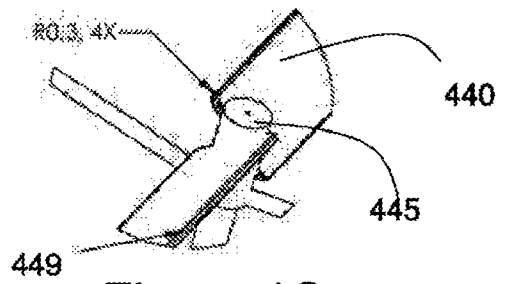


Figura 4C