

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000004496
Data Deposito	25/02/2021
Data Pubblicazione	25/08/2022

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K	1	30

Titolo

RECUPERO DI FARMACI BIOLOGICI O LORO FRAMMENTI DA SOLUZIONI IMPURE
MEDIANTE CRISTALLIZZAZIONE O PRECIPITAZIONE CON MEMBRANE

RECUPERO DI FARMACI BIOLOGICI O LORO FRAMMENTI DA SOLUZIONI IMPURE MEDIANTE CRISTALLIZZAZIONE O PRECIPITAZIONE CON MEMBRANE

Settore dell'invenzione

5 La presente invenzione si riferisce al settore della purificazione di farmaci biologici o loro frammenti.

In particolare, si riferisce alla purificazione di farmaci biologici, ad esempio anticorpi monoclonali, o loro frammenti da una miscela impura mediante l'utilizzo di membrane che ne promuovono la cristallizzazione e/o la
10 precipitazione.

Sfondo dell'invenzione

I farmaci biologici sono medicinali che contengono uno o più principi attivi prodotti o estratti da un sistema biologico. Sono farmaci biologici, ad esempio, gli anticorpi monoclonali, alcuni vaccini, emocomponenti, ormoni e molte altre
15 terapie innovative.

Tra i farmaci biologici, i più interessanti dal punto di vista terapeutico sono gli anticorpi monoclonali.

Un anticorpo (Ab), o immunoglobulina (Ig), ha una struttura composta da due catene lunghe identiche, ciascuna avente massa molare di circa 50 kDa, legate
20 covalentemente l'una all'altra, e due identiche catene corte, ciascuna di massa molare all'incirca di 25 kDa, ciascuna delle quali legata covalentemente ad una catena lunga. Le quattro catene sono disposte in una caratteristica struttura a

“Y”. La parte inferiore o gamba della “Y” è definita regione Fc che è coinvolta nell’ancoraggio dell’anticorpo nella membrana cellulare e come punto di contatto con le cellule macrofaghe per attivare il complemento. Le due “braccia” della “Y” sono definite regione Fab; ciascuna regione Fab contiene una regione costante, in corrispondenza del punto di contatto delle regioni Fab e Fc, e una regione variabile, che si estende alle estremità superiori della “Y”. Ciascuna regione variabile contiene siti identici per il legame con l’antigene a ciascuna estremità della “Y”.

Anticorpi interi, o loro frammenti Fab, sono in grado di riconoscere e legare in maniera specifica proteine, o, in alcuni casi, altre molecole organiche quali peptidi, polisaccaridi, glicoproteine, lipidi, o acidi nucleici, chiamati antigeni o epitopi.

A seguito del legame con l’antigene, l’anticorpo o un suo frammento regolano la risposta del sistema immunitario, che contribuisce alla neutralizzazione, distruzione ed eliminazione del microorganismo infettante o di altre entità dotate di antigene.

Gli anticorpi, in virtù del loro legame specifico e successiva neutralizzazione della cellula bersaglio coinvolta nello stato patologico, sono anche impiegati nel trattamento dei tumori, infiammazioni, eventi infettivi, malattie cardiovascolari, rigetti a seguito di trapianti di organo. Ad esempio, l’anticorpo monoclonale (mAb) Infliximab lega il fattore di necrosi tumorale e ne neutralizza l’azione infiammatoria bloccandone l’interazione con il recettore cellulare superficiale;

mentre il mAb Rituximab bersaglia i β -linfociti maligni legandosi al loro antigene CD20 superficiale.

Il mercato globale degli anticorpi monoclonali è in continua crescita, con una estensione pari a 115.2 US\$ già nel 2018 e con una crescita annuale dell'11%
5 la proiezione del mercato globale è di 140 US\$ entro il 2024 (Monoclonal Antibody Therapeutics Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Volume, Growth, Trends, and Forecast 2016 – 2024).

A partire dalle scorse tre decadi, il numero di anticorpi monoclonali approvati è cresciuto significativamente, con 78 prodotti presenti complessivamente sul
10 mercato a maggio 2018 e oltre 500 prodotti terapeutici basati su anticorpi in fase di sviluppo (Global and China Monoclonal Antibody Market 2019-2025: Roche, Johnson & Johnson, Merck, Novartis, AbbVie and Amgen Dominate the Market).

In contrasto agli sforzi impiegati nella sintesi di nuovi anticorpi e altri farmaci
15 biologici, le tecniche per la loro purificazione, stabilizzazione e il successivo rilascio risultano spesso limitate.

Piattaforme tipicamente impiegate nella fase di purificazione di farmaci biologici, o loro frammenti o derivati, consistono in una sequenza di operazioni unitarie che includono centrifugazione, filtrazione, cromatografia per affinità con
20 proteina-A, cromatografia a scambio ionico (cationico/anionico), inattivazione virale, ultrafiltrazione, diafiltrazione.

Il maggiore limite di tale approccio tecnologico consiste nell'elevato costo della resina a base di proteina-A, che può ammontare a migliaia di dollari per litro di resina a proteina-A, rispetto ad altre resine non di affinità.

5 Metodologie di purificazione di anticorpi monoclonali e altri farmaci biologici con la potenzialità di sostituire almeno uno stadio cromatografico sono la cristallizzazione e la precipitazione. Questi sono processi normalmente poco costosi, robusti e facilmente scalabili.

Tuttavia, benché la cristallizzazione di anticorpi e loro frammenti sia stata oggetto di crescente interesse nelle ultime tre decadi, una ricognizione della
10 letteratura scientifica rivela che la cristallizzazione è stata esplorata esclusivamente per mezzo di tecniche convenzionali di diffusione vapore e *micro-batch* e, generalmente, con l'obiettivo di produrre cristalli destinati ad investigazioni strutturali mediante diffrazione di raggi-X o di neutroni. A questo proposito si vedano ad esempio i seguenti lavori: Mariuzza *et al.* *Crystallization*
15 *of the Fab Fragments of Monoclonal Anti-pazophenylarsonate Antibodies and Their Complexes with Haptens*. The Journal of Biological Chemistry 259/9 (1984) 5954-5958; Harris *et al.* *Refined Structure of an Intact IgG2a Monoclonal Antibody*. Biochemistry 36 (1997) 1581-1597; Harris *et al.* *Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody*. J. Molecular Biology 275/ 5
20 (1998) 861-872; Sapphire *et al.* *Crystal Structure of a Neutralizing Human IgG Against HIV-1: A Template for Vaccine Design*. Science 293/5532 (2001)1155-1159; Yang *et al.* *Optimization of Vapor Diffusion Conditions for Anti-CD20 Crystallization and Scale-Up to Meso Batch*. Crystals 9 (2019) 230, 1-13.

Recentemente, potenziali applicazioni industrialmente rilevanti della cristallizzazione sono stati descritti nella letteratura scientifica. Ad esempio in Zang *et al.* (*Towards Protein Crystallization as a Process Step in Downstream Processing of Therapeutic Antibodies: Screening and Optimization at*
5 *Microbatch Scale*. PlosOne 6/9 (2011) e25282) viene studiata la cristallizzazione di un anticorpo monoclonale IgG4 in modalità diffusione di vapore al fine di usare la cristallizzazione come un passaggio economico di purificazione o di formulazione. Smejkal *et al.* (*Fast and scalable purification of a therapeutic full-length antibody based on process crystallization*.
10 *Biotechnology and Bioengineering* 110/9 (2013) 2452-2461) studia la cristallizzazione di un anticorpo monoclonale IgG1 in esperimenti *micro-batch* per la sua purificazione.

US7833525B2 descrive metodi per la cristallizzazione di anticorpi e loro frammenti a partire da soluzioni ad elevata concentrazione mediante metodo
15 *batch* su larga scala. Tali metodi non sono mediati da membrane; la cristallizzazione è comunemente ottenuta variando un set di condizioni comprendenti la concentrazione proteica, pH e concentrazione del tampone, temperatura, tipo (lunghezza della catena) e concentrazione del glicole polietilenico (PEG), tipo e concentrazione del precipitante, ioni
20 monovalenti/divalenti (se presenti), detergenti o chelanti (se presenti), altri reagenti (se presenti).

US8008447 descrive metodi di cristallizzazione e/o concentrazione di anticorpi o loro frammenti mediante il contatto con soluzioni contenenti sali di un catione divalente (es. sali di zinco o di magnesio) e incubando l'anticorpo o il frammento

nella soluzione fino alla formazione di cristalli. Cristalli e/o gel proteici di anticorpo o di frammento sono impiegabili in composizioni e formulazioni. Tutti i metodi descritti non sono mediati da membrane.

WO2009085765 descrive la purificazione di un anticorpo anti-CD20 a partire da
5 brodi di coltura (HCCF) di cellule mammarie usando un passaggio di cristallizzazione, al fine di eliminare o ridurre gli stadi cromatografici. Tuttavia, è menzionata solo cristallizzazione mediante metodi convenzionali come dialisi o *batch*.

WO2013167720 riguarda la purificazione di anticorpi monoclonali in forma
10 cristallina direttamente da brodi di coltura. Metodi convenzionali di cristallizzazione – come il metodo *batch* – risultano impiegati, e la cristallizzazione è controllata variando un set di condizioni comprendenti, fra altre, pH e forza ionica (bassa) del tampone, concentrazione proteica, presenza di additivi (es. sali, PEG, zuccheri). La velocità di agitazione della soluzione è
15 inoltre riportata essere un mezzo di controllo della nucleazione.

WO2014033126 descrive un metodo per la purificazione di anticorpi monoclonali da brodi di coltura cellulare mediante la precipitazione condotta per mezzo di alcoli alifatici. Specificatamente, il sale di un catione divalente è utilizzato per precipitare impurezze da un brodo di coltura cellulare per produrre
20 un surnatante primario. Il surnatante primario è quindi combinato con alcoli alifatici - es. etanolo - per produrre un precipitato contenente l'anticorpo. Il metodo, che non risulta mediato da una membrana, è quindi applicato ciclicamente per incrementare la purezza dell'anticorpo precipitato.

- WO2015056237 descrive un metodo di purificazione di anticorpi ricombinanti mediante precipitazione impiegando polimeri idrofobici quali PEG. Specificatamente, calcio cloruro è impiegato per precipitare acidi nucleici e impurezze proteiche, mentre acidi grassi sono utilizzati per precipitare altre
- 5 proteine cellulari dal surnatante del brodo di coltura. Il surnatante secondario così ottenuto, comprendente le immunoglobuline, è quindi combinato con PEG per produrre un precipitato contenente l'anticorpo. Il metodo, che non risulta mediato da una membrana, può essere impiegato ciclicamente al fine di incrementare la purezza del precipitato.
- 10 In WO2013160926, Curcio *et al.* descrivono la separazione di isomeri ottici da una miscela racema mediante cristallizzazione diretta mediata dalla nucleazione stereoselettiva sulla superficie di una membrana funzionalizzata con selettori chirali. Più specificatamente, una membrana capace di riconoscere uno specifico isomero ottico mediante interazione enantiospecifica tramite
- 15 selettori chirali quali, ad esempio, β -ciclodestrine, produce un eccesso enantiomerico in fase solida a seguito di nucleazione eterogenea stereoselettiva sulla superficie della membrana stessa. La membrana è specificatamente funzionalizzata per il riconoscimento e legame degli enantiomeri.
- 20 Rimane la necessità di un metodo per la purificazione di anticorpi e altri farmaci biologici che sia efficiente e meno costoso rispetto ai metodi noti, in particolare un metodo che consenta di purificare in maniera efficiente il composto biologico direttamente, ad esempio, da un surnatante della coltura cellulare (CFCS) o dal brodo di coltura cellulare (HCCF) in cui esso è prodotto, o da altri preparati

parzialmente purificati, risultando allo stesso tempo flessibile e scalabile e dunque utilizzabile a livello industriale senza eccessivi costi.

Riassunto dell'invenzione

È stato ora trovato che farmaci biologici, come anticorpi, e/o loro frammenti
5 possono essere purificati da miscele impure, come ad esempio da un brodo di coltura cellulare, mediante l'utilizzo di membrane che ne promuovano la cristallizzazione e/o la precipitazione.

È un oggetto della presente invenzione un metodo per la purificazione, totale o parziale, di uno o più farmaci biologici, ad esempio anticorpi, o loro frammenti,
10 da una miscela, comprendente i seguenti passaggi:

- (a) porre detta miscela contenente detto farmaco biologico da purificare a contatto con una membrana;
- (b) porre un mezzo di scambio comprendente almeno un liquido o almeno un solido disciolto in un liquido o almeno un gas o loro miscele, a
15 contatto con detta membrana, oppure applicare il vuoto, sul lato opposto rispetto a detta miscela contenente il farmaco biologico;
- (c) ottenere la sovrassaturazione di detto farmaco biologico nella miscela in cui esso è contenuto per mezzo di detta membrana;
- (d) ottenere la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco
20 biologico, completamente o in parte, per mezzo di detta membrana;
- (e) raccogliere il prodotto solido formatosi per mezzo della membrana e comprendente detto farmaco biologico;

in cui detta membrana è caratterizzata dall'essere in grado di:

- (i) consentire il trasporto attraverso di essa di una o più sostanze presenti in detta miscela in cui è contenuto il farmaco biologico e/o in detto mezzo di scambio in maniera da ottenere la sovrassaturazione di detto farmaco biologico nella miscela in cui esso è contenuto; e
- (ii) consentire la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico.

In una realizzazione preferita detto farmaco biologico è un anticorpo, preferibilmente un anticorpo monoclonale o un suo frammento.

Il metodo dell'invenzione consente la purificazione di farmaci biologici come anticorpi monoclonali e/o loro frammenti mediante la cristallizzazione e/o la precipitazione assistita da membrane, tipicamente a basso costo, a partire direttamente da un surnatante della coltura cellulare (CFCS) o dal brodo di coltura cellulare (HCCF) o da altri preparati parzialmente purificati, con resa e purezza del prodotto solido recuperato comparabile a quello ottenuto tradizionalmente mediante costosi e poco efficienti processi industriali biofarmaceutici, tipicamente basati su stadi di cromatografia per affinità a resina di proteina-A.

Il metodo dell'invenzione consente un controllo più efficace dei parametri di processo, come il livello di sovrassaturazione, la velocità di nucleazione, la morfologia dei cristalli.

In aggiunta agli aspetti di maggiore economicità del metodo dell'invenzione rispetto a quello convenzionale, l'impiego di un processo a membrana consente una maggiore flessibilità di operazione, facilità di *scale-up* e di automazione, possibilità di operazione in regime di *continuous manufacturing*, tali da favorire
5 una maggiore efficienza del processo produttivo in una logica di intensificazione di processo.

Infine, il mancato o notevolmente ridotto utilizzo di solventi organici e sostanze chimiche tossiche, generalmente impiegate su scala industriale per la rigenerazione di colonne cromatografiche, rappresenta un notevole vantaggio
10 del metodo proposto in termini di sostenibilità ambientale e salvaguardia delle risorse naturali.

Descrizione delle figure

Figura 1. Una realizzazione di un sistema a membrana per la purificazione di anticorpi monoclonali o loro frammenti secondo il metodo dell'invenzione. Esso
15 è composto da un serbatoio 1, eventualmente termostatato, contenente la soluzione con il principio attivo che si vuole purificare (soluzione di alimentazione o "*feed*"); una pompa di ricircolo della soluzione di alimentazione 2; uno o più moduli a membrana 3; un serbatoio contenente il mezzo di scambio 4, eventualmente termostatato; una pompa per il ricircolo del mezzo di
20 scambio 5; una linea di uscita dell'anticorpo cristallizzato/precipitato 6; sistemi di controllo 7, che possono essere monitorati e gestiti da un computer 8, per la verifica dei parametri di processo come, ad esempio, pressione, flusso,

temperatura, analizzatore spettrofotometrico UV-Visibile; una pompa per aggiunta di ulteriore soluzione di alimentazione 9.

Figura 2. Una membrana in polipropilene utilizzata per la purificazione di anticorpi monoclonali o loro frammenti secondo il metodo dell'invenzione.

5 Figura 3. Cristalli dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 ottenuti mediante il metodo dell'invenzione.

Figura 4. Analisi Dynamic Light Scattering (DLS) di: (A) soluzione di alimentazione non trattata; (B) cristalli disciolti dopo purificazione a membrana.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

10 Nell'ambito della presente invenzione, i termini "circa" e/o "approssimativamente" indicano che i valori a cui si riferiscono gli stessi sono esattamente quelli indicati, vicini o simili.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "attività" è riferito, secondo la termodinamica, alla "concentrazione effettiva" di una sostanza in una miscela e
15 stimata dalla concentrazione nominale di quella sostanza usando un coefficiente di attività, come sarebbe compreso da un esperto nella tecnica.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "solido amorfo" indica una forma solida non cristallina, a volte indicata come "precipitato amorfo" o "precipitato", che non ha una struttura reticolare molecolare ordinata tipica dello
20 stato solido cristallino.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "antisolvente" oppure "non-solvente" indica una sostanza, generalmente in fase fluida, in cui uno o più farmaci biologici risultano scarsamente solubili.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "prodotto biologico" o "farmaco biologico" o "farmaco" si riferisce a un prodotto farmaceutico isolato da fonti naturali, come umane, animali o microrganismi. I prodotti biologici comprendono anticorpi, frammenti di anticorpi, anticorpi bispecifici, anticorpi monoclonali, anticorpi policlonali, anticorpi coniugati, vaccini, sangue e componenti del sangue, allergeni, proteine terapeutiche ricombinanti, polipeptidi, proteine di fusione, prodotti utilizzati in terapie cellulari e geniche ("*cell and gene therapy*"), come cellule o vettori virali, farmaci biosimilari. Per " frammento di farmaco biologico" si intende una qualsiasi porzione, anche non farmaceuticamente attiva, del farmaco. Ad esempio, un suo polipeptide di almeno 2 amminoacidi. In particolare, il termine " frammento di anticorpo" indica una porzione di un intero anticorpo, ad esempio un frammento Fv a catena singola o un frammento di anticorpo Fab o qualsiasi altro frammento dell'intera struttura di anticorpo, anche non farmaceuticamente attivo, avente una massa molare minima di 12 kDa.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "solido cristallino" o "prodotto cristallino" si riferisce a un materiale solido i cui costituenti (come atomi, molecole o ioni) sono disposti in una struttura microscopica altamente ordinata, formando un reticolo che si estende in tutte le direzioni.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "cristallizzazione" si riferisce a qualsiasi tipo di processo chimico o fisico che genera un prodotto solido cristallino.

5 Nell'ambito della presente invenzione, il termine "funzionalizzato" si riferisce a una membrana in cui sono stati aggiunti gruppi funzionali o strati o molecole di rivestimento, mediante opportuni processi chimici o fisici, ad esempio: legame covalente, rivestimento, trattamento al plasma, irradiazione UV, imprinting molecolare, al fine di promuovere interazioni specifiche tra la membrana e una o più sostanze.

10 Nell'ambito della presente invenzione, il termine "nucleazione eterogenea" si riferisce alla formazione di nuclei cristallini e/o aggregati amorfi sulla superficie, all'interno dei pori o in qualsiasi altra posizione di una membrana, come risultato di qualsiasi tipo di interazione tra la membrana e le molecole del composto da cristallizzare o precipitare.

15 Nell'ambito della presente invenzione, il termine "miscela" indica una soluzione omogenea o una fase eterogenea comprendente componenti diversi fra loro.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "macroporoso" è riferito a un materiale poroso con una dimensione media dei pori superiore a 50 nm.

20 Nell'ambito della presente invenzione, il termine "mesoporoso" è riferito a un materiale poroso con una dimensione media dei pori compresa tra 2 nm e 50 nm.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "microporoso" è riferito a un materiale poroso con una dimensione media dei pori inferiore a 2 nm.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "denso" è riferito a un materiale che non presenta pori apparenti di dimensione media superiore a 1 nm.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "membrana" indica una barriera fisica, liquida e/o solida, realizzata con materiali organici o inorganici, ad esempio materiali polimerici o ceramici o metallici, o con una loro
5 combinazione in strutture ibride o composite, in grado di promuovere il trasporto selettivo di uno o più componenti da una miscela.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "modulo" indica un'unità in grado di contenere una o più membrane posizionate in un alloggiamento o
10 recipiente con una o più entrate e una o più uscite.

Nell'ambito della presente invenzione, con il termine "anticorpo" si intende una proteina in grado di riconoscere e legare in maniera specifica proteine, o, in alcuni casi, altre molecole organiche quali peptidi, polisaccaridi, glicoproteine, lipidi, o acidi nucleici, chiamati antigeni o epitopi. In particolare, rientrano nella
15 definizione di anticorpo: anticorpi monoclonali, anticorpi bispecifici, anticorpi policlonali, anticorpi coniugati, anticorpi biosimilari.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "anticorpi monoclonali" o "mAbs" si riferisce ad anticorpi prodotti da cellule mammarie identiche che sono tutti cloni di una cellula madre univoca. Gli anticorpi monoclonali possono avere
20 affinità monovalente, in quanto si legano allo stesso epitopo, cioè la parte di un antigene che è riconosciuta selettivamente dall'anticorpo. Detto anticorpo monoclonale può anche essere modificato successivamente alla sua produzione dalla cellula purché mantenga la capacità di legare

specificatamente il suo antigene. Con il termine “anticorpo monoclonale” si intende anche un anticorpo che comprende elementi derivanti da due o più anticorpi monoclonali, ad esempio un anticorpo monoclonale bispecifico (BsMAb o BsAb), cioè una proteina composta di frammenti di due diversi anticorpi monoclonali in grado di legarsi contemporaneamente a due diversi tipi di antigene. Rientra nella definizione di “anticorpo monoclonale” anche un anticorpo monoclonale coniugato, cioè un anticorpo monoclonale legato ad un ulteriore elemento terapeutico, come un farmaco, un isotopo radioattivo, uno ione o una tossina citotossica.

10 Nell’ambito della presente invenzione, il termine “anticorpo policlonale” indica una miscela di anticorpi monoclonali espressi da più linee cellulari in grado di interagire con più epitopi.

Nell’ambito della presente invenzione, il termine “farmaco biosimilare” o “biosimilare” o “biosimile” indica un farmaco biologico che svolge la stessa funzione terapeutica di un altro farmaco biologico (detto “originario”) al quale è appunto simile ed analogo per caratteristiche fisico-chimiche, efficacia clinica e sicurezza. Il biosimilare ha tipicamente una struttura chimica differente rispetto al farmaco biologico originario e può essere ottenuto per sintesi chimica.

20 Nell’ambito della presente invenzione, il termine "precipitante" indica una sostanza inorganica, organica o polimerica o una loro miscela in grado di ridurre la solubilità di uno o più farmaci biologici in una soluzione di qualsiasi composizione.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "precipitazione" si riferisce a qualsiasi tipo di processo chimico o fisico che produce un solido amorfo, cioè non cristallino.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "solido" o "prodotto solido" o "fase solida" si riferisce indifferentemente ad un solido cristallino o ad un precipitato solido o ad una loro miscela di qualsiasi composizione.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "solvente" indica una sostanza, generalmente in fase liquida, che dissolve uno o più farmaci biologici producendo una soluzione.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "sovrassaturazione" indica la condizione di una soluzione in cui il componente da cristallizzare o precipitare è presente in una concentrazione superiore al suo valore di solubilità. L'estensione di una soluzione sovrassatura è espressa quantitativamente dalla "sovrassaturazione", un parametro dato dal rapporto tra la concentrazione effettiva del componente da cristallizzare o precipitare e la sua solubilità alla temperatura e pressione operativa.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "facoltativo" indica che l'evento o la circostanza descritti in seguito possono o non possono verificarsi e che la descrizione comprende i casi in cui si verifica l'evento o la circostanza e casi in cui non si verifica. Ad esempio, la frase "facoltativamente con aggiunta di acido o base" significa che questa descrizione può includere l'aggiunta di un acido o l'aggiunta di una base o l'assenza di qualsiasi aggiunta.

Nell'ambito della presente invenzione, il termine "tipicamente" o "eventualmente" si riferisce a qualcosa che accade di solito, ma non sempre, in modo distintivo; pertanto, l'uso del termine "tipicamente" o "eventualmente" non esclude il verificarsi di eventi che differiscono da quelli specificamente
5 menzionati nel testo.

Il metodo dell'invenzione ha lo scopo di purificare, almeno parzialmente, un farmaco biologico, o suoi frammenti, da una miscela in cui detto farmaco è presente insieme ad altri componenti. Per purificazione si intende in particolare l'ottenimento del farmaco con un grado di purezza di almeno il 90% in
10 monomero, preferibilmente maggiore di 95% in monomero.

Il metodo dell'invenzione può essere utilizzato per purificare qualunque farmaco biologico. Preferibilmente, è usato per la purificazione di anticorpi monoclonali o loro frammenti. Un esempio è l'anticorpo monoclonale anti-CD20, intero o suoi frammenti. Detto anticorpo monoclonale anti-CD20 può ad esempio essere
15 purificato da surnatante di coltura cellulare chiarificato.

Detto farmaco biologico può essere qualunque prodotto farmaceutico isolato da una fonte naturale, ad esempio una fonte umana, animale o un microrganismo. In particolare può essere un farmaco ottenuto da una coltura cellulare, ad esempio una coltura batterica, mediante le tecniche del DNA ricombinante. In
20 particolare, detto farmaco biologico può essere scelto fra: anticorpo, frammento di anticorpo, anticorpo bispecifico, anticorpo monoclonale, anticorpo policlonale, anticorpo coniugato, vaccino, componente del sangue, allergene, proteina terapeutica ricombinante, polipeptide, proteina di fusione, ormone, un prodotto

utilizzato in una terapia cellulare e genica (“*cell and gene therapy*”), come una cellula o un vettore virale, e un farmaco biosimilare.

In una realizzazione, detta miscela in cui si trova il farmaco da purificare è un surnatante di coltura cellulare chiarificato (CFCS) o un brodo di coltura cellulare
5 (HCCF).

Nel passaggio a) del metodo dell’invenzione, la miscela contenente detto farmaco biologico da purificare viene posta a contatto con una membrana.

Detta miscela contenente il farmaco biologico da purificare è qui anche denominata “soluzione di alimentazione” o “*feed*”.

10 Tipicamente detta miscela comprende il farmaco biologico, ad esempio un anticorpo monoclonale, e/o suoi frammenti in un solvente liquido ed eventuali altri componenti. Tipicamente il farmaco da purificare si trova in una miscela omogenea.

Detto solvente liquido può essere un qualunque liquido in grado di dissolvere il
15 farmaco biologico, dando così origine ad una soluzione di detto farmaco.

In alcune realizzazioni, il farmaco si trova già in miscela con almeno un solvente liquido e non è quindi necessario aggiungere ulteriori solventi.

In una realizzazione alternativa, il farmaco non si trova in forma disciolta, ad esempio è in forma cristallizzata o precipitata, ed è dunque necessario
20 aggiungere almeno un solvente liquido idoneo per ottenere la miscela da utilizzare nel passaggio a) del metodo dell’invenzione. Ad esempio, in una realizzazione il metodo dell’invenzione viene ripetuto più volte sul prodotto

solido ottenuto al termine di ogni esecuzione del processo e detto prodotto solido viene miscelato con almeno un opportuno solvente liquido prima del suo riutilizzo nel metodo.

In una realizzazione, la miscela, o soluzione di alimentazione, è una soluzione
5 derivante da una coltura cellulare, ad esempio ricombinante, dalla quale è stato sintetizzato il farmaco biologico stesso.

In una realizzazione preferita, la soluzione di alimentazione comprende il surnatante di coltura cellulare chiarificato (CFCS) o brodo di coltura cellulare (HCCF). Detto surnatante o detto brodo di coltura possono essere ottenuti,
10 mediante le comuni tecniche del settore, dalla coltura cellulare dalla quale è stato sintetizzato il farmaco biologico stesso mediante tecnologia del DNA ricombinante, a seguito della rimozione di cellule (o loro frammenti) utilizzate per l'espressione del principio attivo stesso.

In una realizzazione, la soluzione di alimentazione comprende una soluzione
15 impura o parzialmente o totalmente purificata del farmaco biologico.

Per soluzione impura si intende una soluzione in cui il farmaco biologico è presente in soluzione con altri elementi e composti.

Per parzialmente purificata si intende che la soluzione è già stata precedentemente sottoposta ad almeno una procedura di purificazione. La
20 procedura di purificazione può essere, ad esempio: centrifugazione, filtrazione, microfiltrazione, ultrafiltrazione, nanofiltrazione, dialisi, filtrazione e/o inattivazione virale, cromatografia di affinità a proteina-A, cromatografia a scambio cationico e/o anionico, cromatografia di esclusione dimensionale,

cromatografia a fase inversa, cromatografia di interazione idrofobica, cromatografia in modalità mista o cromatografia a idrossiapatite. Tutte queste tecniche sono ben note e non necessitano di ulteriori dettagli.

Per soluzione totalmente purificata si intende che comprende il farmaco biologico già purificato. Ad esempio, il metodo dell'invenzione può essere applicato su una soluzione già purificata del farmaco per ottenerne la cristallizzazione in un'altra condizione morfologica. Ciò può essere utile per scopi tecnologici in quanto la forma cristallina del farmaco influisce sulla sua biodisponibilità quando somministrato ad un soggetto. Ad esempio può essere utile per ottenere forme cristalline del farmaco che si sciolgono più velocemente.

Detta soluzione di alimentazione può anche essere parzialmente purificata prima dell'esecuzione del metodo dell'invenzione mediante uno o più processi di separazione, come ad esempio centrifugazione, filtrazione, microfiltrazione, dialisi, ultrafiltrazione e/o filtrazione/inattivazione virale.

In una realizzazione, la soluzione di alimentazione prima di essere utilizzata nel passaggio a) del presente metodo può essere concentrata di un fattore >1 al fine di fornire una maggiore concentrazione di farmaco biologico. La concentrazione della soluzione può essere ottenuta usando una qualsiasi delle tecniche comunemente disponibili come, ad esempio, centrifugazione, ultrafiltrazione/diafiltrazione, come noto ad un esperto della tecnica.

In una realizzazione, la soluzione di alimentazione prima di essere utilizzata nel passaggio a) del presente metodo può essere sottoposta ad uno scambio di

tampone al fine di ottenere condizioni favorevoli alla cristallizzazione e/o alla precipitazione, in particolare per ottenere un dato pH o forza ionica. Detto scambio di tampone può essere realizzato, ad esempio, mediante dialisi, filtrazione su gel su colonna, diafiltrazione, come può essere compreso da un
5 esperto del campo. Tamponi tipici includono, ma non sono limitati a, tris (idrossimetil) aminometano (TRIS), istidina, acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinetanesolfonico (HEPES), acetato, borato, carbonato, fosfato, cacodilato, succinato, imidazolo, facoltativamente con aggiunta di acido o base, ad esempio acido acetico, acido cloridrico, idrossido di sodio, acido
10 etilendiamminotetraacetico (EDTA), per regolare il pH su un valore adeguato. I tamponi vengono preparati in un intervallo tipico di concentrazione da circa 1 mM a circa 2 M. Nel caso in cui lo scambio di tampone determini la formazione di un precipitato contenente impurità, il precipitato può essere rimosso mediante filtrazione o centrifugazione o mediante qualsiasi altra tecnica adatta.

15 In una realizzazione, la soluzione di alimentazione può ulteriormente comprendere uno o più composti precipitanti allo scopo di facilitare la cristallizzazione e/o la precipitazione del farmaco biologico che si desidera purificare. Per composto precipitante si intende un composto in grado di favorire la cristallizzazione e/o la precipitazione del farmaco biologico che si desidera
20 purificare. Detto composto precipitante può essere dunque scelto dall'esperto nel settore in base al farmaco da purificare. Precipitanti tipici includono, ma non sono limitati a: CaCl_2 , LiCl , Li_2SO_4 , MgCl_2 , MgSO_4 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 , KCl , K_2SO_4 , e sono tipicamente usati in un intervallo di concentrazione di circa 1 mM fino a 2 M.

In una realizzazione, la soluzione di alimentazione può ulteriormente comprendere uno o più additivi al fine di facilitare la cristallizzazione e/o la precipitazione del farmaco biologico che si desidera purificare. Detto additivo può essere dunque scelto dall'esperto nel settore in base al farmaco da purificare. Additivi tipici includono, a titolo esemplificativo, polietilenglicole (PEG) con diversa massa molare, ad esempio PEG 400, PEG 1500, PEG 2000, PEG 3000, PEG 10000, PEG 20000, PEG 40000, in un intervallo di concentrazione tipico di circa l'1% fino al 50%; zuccheri, ad esempio saccarosio, trealosio, in un intervallo di concentrazione tipico di circa 1 mM fino a 2 M; glicerina e/o 2-propanolo e/o 1,4-diossano e/o glicole etilenico, in un intervallo di concentrazione tipico di circa l'1% fino al 50%.

Ad esempio, la soluzione di alimentazione può essere miscelata con una soluzione precipitante contenente PEG 400 e Na_2SO_4 , in un rapporto di volume 1:1 tra le due soluzioni.

In una realizzazione, la soluzione di alimentazione comprende cristalli e/o precipitati amorfi di detto farmaco da purificare. Tale procedura di semina, anche detta "*seeding*", può vantaggiosamente promuovere la formazione di cristalli del farmaco e di conseguenza aumentare la resa del processo.

Nel passaggio b) del metodo dell'invenzione un mezzo di scambio viene posto in contatto con la membrana sul lato opposto rispetto alla soluzione contenente il farmaco biologico da purificare.

Il mezzo di scambio e la soluzione di alimentazione non sono pertanto direttamente in contatto ma sono separati da una membrana.

Il mezzo di scambio può essere qui anche denominato mezzo di estrazione.

Il mezzo di scambio può essere un liquido o una miscela di liquidi, oppure una miscela di almeno un liquido con uno o più solidi oppure una miscela di almeno un liquido e almeno un polielettrolita oppure almeno un gas o una miscela
5 gassosa.

Il mezzo di scambio può essere scelto in base alle caratteristiche del farmaco biologico da purificare e della membrana utilizzata. L'esperto nel settore sa come sceglierlo sulla base delle sue conoscenze nel settore.

Ad esempio il mezzo di scambio può comprendere uno o più solventi oppure
10 uno o più non-solventi del farmaco biologico che si desidera purificare.

In una realizzazione, il mezzo di scambio è un liquido puro o una miscela di due o più liquidi in qualsiasi composizione. Detto liquido può essere ad esempio acqua, metanolo, etanolo, propanolo, acetone, etere dietilico, esano, pentano, liquidi ionici, glicole etilenico o miscele tra essi. In una realizzazione, detto
15 liquido o miscela di liquidi è scelto in maniera tale da comportarsi come un non-solvente rispetto al farmaco biologico da purificare. L'esperto nel settore sa come identificare un non-solvente rispetto a un determinato composto.

In una realizzazione, il mezzo di scambio è una miscela di almeno un liquido e almeno un solido solubile disciolto in concentrazione compresa ad esempio tra
20 1% e 50%. Detto solido solubile può essere ad esempio NaCl, MgCl₂, CaCl₂, saccarosio. Ad esempio il mezzo di scambio può contenere soluzioni acquose di MgCl₂ 14 wt% o MgCl₂ 22 wt%.

In una realizzazione, il mezzo di scambio è una miscela di almeno un liquido e almeno un polielettrolita, ad esempio alcool polivinilico o glicole polietilenico.

In una realizzazione, il mezzo di scambio è una miscela gassosa, ad esempio aria, o un gas inerte, ad esempio N₂.

- 5 In una realizzazione, nel passaggio b) del metodo sul lato opposto rispetto a detta soluzione contenente il farmaco biologico viene applicato il vuoto.

Nel passaggio (c) del metodo dell'invenzione si ottiene la sovrassaturazione di detto farmaco biologico nella miscela in cui esso è contenuto per mezzo della membrana che separa la miscela contenente il farmaco biologico da purificare e
10 il mezzo di scambio.

La sovrassaturazione è ottenuta grazie alle caratteristiche della membrana, come sopra definite, in particolare grazie alla caratteristica (i), cioè: consentire il trasporto attraverso di essa di una o più sostanze presenti nella soluzione in cui è contenuto il farmaco biologico e/o nel mezzo di scambio, in maniera da
15 ottenere la sovrassaturazione di detto farmaco biologico nella soluzione in cui esso è contenuto.

La sovrassaturazione di detto farmaco biologico nella soluzione in cui esso è contenuto è dunque ottenuta mediante il trasporto di massa di una o più sostanze scambiate attraverso detta membrana.

- 20 La sovrassaturazione del farmaco nella soluzione in cui è contenuto è tipicamente determinata dalla velocità di trasferimento di uno o più composti attraverso la membrana, cioè dal flusso transmembrana. Come noto, il flusso transmembrana è una funzione delle caratteristiche morfologiche della

membrana, come porosità, tortuosità, distribuzione delle dimensioni dei pori, spessore, e delle condizioni operative.

Come noto all'esperto nel settore, la regolazione del flusso transmembrana può anche influenzare la dimensione e la morfologia dei cristalli prodotti o delle
5 particelle precipitate.

In alcune realizzazioni, il trasporto di massa di una o più sostanze scambiate attraverso detta membrana è promosso da una differenza di pressione parziale del solvente o del non-solvente e/o di attività del solvente o del non-solvente e/o di temperatura e/o di pressione idraulica e/o di pressione osmotica e/o di
10 potenziale elettrochimico delle soluzioni in contatto su entrambi i lati della membrana.

In una realizzazione, il trasporto di massa attraverso la membrana è promosso da una differenza di pressione parziale della sostanza scambiata tra la soluzione di alimentazione e il mezzo di scambio. Questo gradiente è
15 determinato da una differenza di attività della sostanza trasportata tra la soluzione di alimentazione e il mezzo di scambio e/o da una differenza di temperatura tra la soluzione di alimentazione e il mezzo di scambio.

In particolare, in una realizzazione, l'intera membrana o almeno uno dei suoi strati è porosa, presenta un carattere idrofobo e consente il trasporto di almeno
20 un solvente in fase vapore dalla soluzione di alimentazione verso il mezzo di scambio, quindi portando ad un aumento della concentrazione del farmaco biologico fino al raggiungimento della sovrassaturazione desiderata.

In un'altra realizzazione, l'intera membrana o almeno uno dei suoi strati è porosa, presenta un carattere idrofobo e consente il trasporto di almeno un non-solvente in fase vapore dal mezzo di scambio verso la soluzione di alimentazione, quindi portando a una riduzione della solubilità del farmaco biologico fino al raggiungimento della sovrasaturazione desiderata. Non-solventi preferiti includono, ma non sono limitati a: alcoli, chetoni, acidi carbossilici, esteri, eteri, alcani, acqua, ammine, sali di ammonio quaternario, liquidi ionici, anidride carbonica gassosa e liquidi supercritici. Esempi di non-solventi particolarmente preferiti includono acqua, metanolo, etanolo, esano, pentano, polietilenglicole, acetone, liquidi ionici che comprendono complessi acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) (metallo), CO₂ supercritica.

In un'altra realizzazione, il trasporto di massa attraverso la membrana è promosso da un gradiente di pressione idraulica e/o di pressione osmotica tra la soluzione di alimentazione e il mezzo di scambio.

In particolare, in una realizzazione, l'intera membrana o almeno uno dei suoi strati è denso, presenta un carattere idrofilico e consente il trasporto di almeno un solvente in fase liquida dalla soluzione di alimentazione verso il mezzo di scambio, quindi portando ad un aumento della concentrazione del farmaco biologico fino al raggiungimento della sovrassaturazione desiderata.

In un'altra realizzazione, l'intera membrana o almeno uno dei suoi strati è denso, presenta un carattere idrofilico e consente il trasporto di almeno un non-solvente in fase liquida dal mezzo di scambio verso la soluzione di

alimentazione, quindi portando ad una diminuzione della solubilità del farmaco biologico fino al raggiungimento della sovrassaturazione desiderata.

In un'altra realizzazione, il trasporto di massa di una o più sostanze attraverso la membrana è promosso da una differenza di attività delle sostanze trasportate
5 e/o da una differenza di potenziale elettrochimico tra la soluzione di alimentazione e il mezzo di scambio.

In particolare, in una realizzazione, l'intera membrana o almeno uno dei suoi strati è caricata elettricamente a causa della presenza di gruppi funzionali ionizzabili e consente uno scambio selettivo di cationi e/o anioni che inducono
10 una variazione del pH o della forza ionica o una variazione della concentrazione del precipitante e che determinano condizioni favorevoli alla cristallizzazione e/o alla precipitazione di uno o più farmaci biologici. La membrana così caricata è anche detta membrana a scambio ionico.

In un'altra realizzazione, il trasporto di una o più sostanze attraverso la
15 membrana è promosso da o avviene in presenza di un campo elettrico e/o magnetico applicato alla membrana.

In particolare, in una realizzazione, l'intera membrana o almeno uno dei suoi strati è elettricamente conduttivo e consente l'attrazione/repulsione sulla superficie della membrana e/o il trasporto selettivo di molecole caricate
20 elettricamente che determinano condizioni favorevoli alla cristallizzazione e/o alla precipitazione di uno o più farmaci biologici.

Una membrana elettricamente conduttiva è ad esempio realizzata da polimeri intrinsecamente conduttori, oppure rivestita con materiali elettricamente

conduttivi, ad esempio mediante deposizione chimica in fase vapore (CVD), deposizione fisica in fase vapore (PVD) o rivestimento.

Sulla base delle conoscenze generali nel settore e delle indicazioni sopra riportate, l'esperto nel settore è in grado di scegliere la modalità di trasporto di
5 materia desiderata e le opportune caratteristiche fisico-chimiche della membrana.

Nel passaggio d) del metodo dell'invenzione viene ottenuta la cristallizzazione e/o la precipitazione completa o in parte di detto farmaco biologico per mezzo della membrana che separa la miscela contenente il farmaco biologico e il
10 mezzo di scambio.

La cristallizzazione e/o la precipitazione del farmaco biologico sono ottenute grazie alle caratteristiche della membrana, in particolare la sua caratteristica (ii), cioè consentire la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico, e alle condizioni operative.

15 Preferibilmente, la membrana promuove la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico.

La membrana può promuovere la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico mediante interazioni specifiche promosse dalla membrana, o da almeno uno dei suoi strati, con i prodotti che si desidera purificare dalla
20 soluzione sovrasatura.

In una realizzazione, la membrana è in grado di promuovere specifiche interazioni che consentono la cristallizzazione e/o la precipitazione di uno o più farmaci biologici mediante proprietà fisico-chimiche intrinseche dell'intera

membrana o di almeno uno dei suoi strati. Dette proprietà dipendono dalla natura dei materiali organici e/o inorganici che compongono la membrana stessa. Detti materiali sono preferibilmente scelti fra: polimeri, come ad esempio polipropilene, polietilene, politetrafluoroetilene, polivinilidene fluoruro, polisulfone, poliimmide, poliammide, chitosano, alginato; zeoliti, silica, allumina, metalli, leghe.

In una realizzazione, la membrana è in grado di promuovere specifiche interazioni che consentono la cristallizzazione e/o la precipitazione di uno o più farmaci biologici grazie a modifiche e/o funzionalizzazione dell'intera membrana o di almeno uno dei suoi strati con uno o più composti denominati ricognitori molecolari. Detti ricognitori molecolari possono essere antigeni naturali o sintetici in grado di legarsi in modo specifico con il farmaco biologico, anticorpi naturali o sintetici o loro frammenti capaci di uno specifico riconoscimento geometrico, aminoacidi, polipeptidi, polimeri a stampo molecolare, polisaccaridi lineari o ciclici, composti naturali o sintetici adatti a dare origine a interazioni idrofobiche, di tipo "chiave-serratura", ioniche, riconoscimento di dimensioni o simili.

In una realizzazione, la membrana è in grado di promuovere specifiche interazioni che consentono la cristallizzazione e/o la precipitazione di uno o più farmaci biologici all'interfaccia o all'interno dei pori della membrana stessa mediante proprietà morfologiche intrinseche determinate, ad esempio, da dimensione dei pori e/o forma dei pori e/o porosità e/o rugosità della membrana stessa o di almeno uno dei suoi strati.

In una realizzazione, l'intera membrana o almeno uno dei suoi strati comprende almeno un riempitivo (*filler*) microporoso e/o mesoporoso e/o macroporoso e/o un materiale a struttura gerarchica ottenendo così una membrana a matrice mista. Detti materiali a struttura gerarchica possono essere ad esempio zeoliti,
5 *metal organic frameworks* (MOF), materiali bidimensionali (2D), grafene, ossido di grafene, nanotubi di carbonio, silica.

In una realizzazione, la membrana in grado di promuovere specifiche interazioni che consentono la cristallizzazione e/o la precipitazione di uno o più farmaci biologici è una membrana a scambio ionico o qualunque membrana
10 elettricamente conduttiva e/o magneticamente responsiva. In questa realizzazione, le interazioni promosse dalla membrana dipendono anche dalla carica elettrica assunta in funzione del pH o dalla forza ionica da una o più componenti presenti nella soluzione di alimentazione.

Sulla base delle conoscenze generali nel settore e delle indicazioni sopra
15 riportate, l'esperto nel settore è in grado di scegliere la modalità di interazione desiderata e, di conseguenza, le opportune caratteristiche fisico-chimiche della membrana.

La membrana può essere composta da uno o più strati di uguale o diversa composizione e caratteristiche.

20 La membrana utilizzata nel metodo dell'invenzione può quindi essere porosa o densa o almeno uno dei suoi strati può essere poroso o denso. Ad esempio, detta membrana può essere porosa con una dimensione media dei pori

compresa tra 0,1 nm e 10 µm, ad esempio 0,2 µm, oppure densa con una dimensione media dei pori inferiore a 0,1 nm.

La membrana può inoltre presentare un carattere idrofilo o idrofobo, o almeno uno dei suoi strati può presentare un carattere idrofilo o idrofobo oppure la
5 membrana può mostrare aree idrofiliche alternate con aree idrofobiche. Per idrofilico si intende che l'angolo di contatto con l'acqua è minore di 90°. Per idrofobico si intende che l'angolo di contatto con l'acqua è maggiore di 90°.

Nel metodo della presente invenzione la membrana può svolgere quindi le seguenti funzioni principali:

10 rimuovere parzialmente almeno un solvente dalla soluzione di alimentazione al fine di incrementare la concentrazione del prodotto biologico al disopra della saturazione, e/o

aggiungere almeno un non-solvente alla soluzione di alimentazione al fine di ridurre la solubilità del prodotto biologico, rispettivamente, e/o

15 consentire uno scambio selettivo di cationi e/o di anioni mediante, eventualmente, una variazione di pH o della forza ionica o della concentrazione di un agente precipitante al fine di determinare una condizione favorevole alla cristallizzazione e/o alla precipitazione, e/o

consentire l'attrazione o la repulsione alla superficie della membrana e/o il
20 trasporto selettivo di molecole cariche elettricamente che determini le condizioni favorevoli per la cristallizzazione e/o la precipitazione.

Quindi, la membrana può essere utilizzata per rimuovere parzialmente almeno un solvente dalla soluzione che comprende il farmaco biologico allo scopo di aumentare la concentrazione di detto farmaco al di sopra della saturazione. In alternativa, la membrana può essere utilizzata per aggiungere almeno un non-
5 solvente a detta soluzione allo scopo di ridurre la solubilità del prodotto biologico.

In alcune realizzazioni l'intera membrana o almeno uno dei suoi strati è modificata e/o funzionalizzata con ricognitori molecolari in grado di esercitare interazioni molecolari specifiche con i farmaci biologici.

10 In una realizzazione, detta membrana è a matrice di un composito organico o inorganico o misto. Ad esempio, una membrana può essere realizzata di polivinilidene fluoruro in cui sono dispersi in maniera omogenea nella matrice polimerica delle particelle di silice mesoporosa.

In un'altra realizzazione esemplificativa, può essere usata una membrana in
15 polipropilene, funzionalizzata o meno, oppure una membrana porosa di fluoruro di polivinilidene (PVDF), funzionalizzata o meno; ad esempio la membrana può essere funzionalizzata con alcol polivinilico reticolato con glutaraldeide.

La membrana può essere fabbricata in qualsiasi forma possibile, tra cui piana, tubolare, fibra cava, fibra cava ritorta, fibra cava a più fori, capillare.

20 L'esperto nel settore è in grado di scegliere o ottenere una membrana avente dette caratteristiche (i) e (ii) in base al farmaco biologico che si desidera purificare e ad altre eventuali condizioni operative.

Sono note e commercialmente disponibili membrane in grado di consentire il trasporto selettivo di sostanze e di promuovere la cristallizzazione e/o la precipitazione di prodotti biologici. In alcune realizzazioni, una membrana commerciale può essere usata nel metodo della presente invenzione. In altre
5 realizzazioni, una membrana commerciale può essere opportunamente modificata dall'esperto nel settore in base all'applicazione desiderata del metodo. In altre realizzazioni, la membrana può essere opportunamente disegnata dall'esperto nel settore. L'esperto è pertanto in grado in base alle conoscenze generali nel settore, in considerazione in particolare della molecola
10 da purificare e della composizione della soluzione in cui essa è contenuta, di reperire e/o ottenere una membrana idonea per la purificazione del farmaco biologico desiderato. L'esperto può ad esempio eseguire opportuni test per valutare la compatibilità tra una membrana commerciale o appositamente realizzata e la soluzione contenente il farmaco da purificare al fine di scegliere
15 una membrana idonea o modificare la membrana per renderla compatibile.

La membrana può essere inserita in un modulo. Le tipologie comuni di moduli includono, ma non sono limitate a, cella a flusso tangenziale, "*plate and frame*", "*dead end*", spirale avvolta, tubo.

La membrana può anche essere inserita in un alloggiamento o contenitore
20 apposito. Ad esempio, un modulo può contenere una o più membrane posizionate in un alloggiamento o recipiente con una o più entrate e una o più uscite.

In una realizzazione, il metodo dell'invenzione è realizzato in modalità discontinua o *batch*. In detta realizzazione, la soluzione e il mezzo di scambio possono essere a contatto con la membrana per un qualunque tempo ritenuto idoneo. Detto tempo può essere scelto dall'esperto nel settore in base al
5 prodotto che si vuole purificare, alla soluzione e al mezzo di estrazione utilizzato, alle caratteristiche della membrana, alla cinetica di cristallizzazione o precipitazione e alle condizioni operative. Il tempo può quindi essere molto variabile, tipicamente varia da 1 minuto a 72 ore.

In altre realizzazioni, il metodo è realizzato in modalità continua e non vi è
10 quindi un tempo minimo di contatto tra la soluzione e il mezzo di scambio e la membrana.

Nel passaggio d) del metodo dell'invenzione, grazie alle caratteristiche della membrana sopra descritte e alle condizioni operative adottate, viene quindi
15 ottenuta la cristallizzazione e/o la precipitazione completa o in parte di detto farmaco biologico.

La cristallizzazione dà luogo a un prodotto solido cristallino. La precipitazione dà luogo a un prodotto solido amorfo. Il prodotto solido, o almeno una parte di esso, può formarsi in qualunque punto della membrana, in particolare sulla sua superficie o nei suoi pori.

20 Il passaggio d) può anche verificarsi, almeno in parte, contemporaneamente al passaggio c), cioè la cristallizzazione e/o precipitazione del prodotto può verificarsi anche mentre è ancora in corso il processo di sovrassaturazione del farmaco nella sua soluzione.

In fine, nel passaggio e) del metodo dell'invenzione, il solido che si è formato per mezzo della membrana viene raccolto. La rimozione può essere eseguita, ad esempio, mediante centrifugazione o filtrazione; il solido raccolto può essere poi disciolto o sospeso. Tipicamente detto solido è in forma di cristalli o di precipitato amorfo o una loro miscela.

Detto prodotto solido cristallino e/o amorfo può essere recuperato sulla superficie della membrana e/o all'interno del modulo che contiene la membrana e/o in una parte diversa del sistema utilizzato per implementare il metodo dell'invenzione.

In una realizzazione, la membrana è inserita in un modulo e il prodotto solido cristallino e/o amorfo viene recuperato in un compartimento diverso dal modulo a membrana a seguito della circolazione forzata della soluzione in un serbatoio di raccolta. Ad esempio, una parte del prodotto solido, ad esempio i nuclei di cristallizzazione, si forma sulla membrana e viene poi convogliato in un compartimento separato di detto modulo nel quale detto prodotto solido continua ad accrescersi.

La forma, la dimensione e la distribuzione dimensionale del prodotto solido cristallino e/o amorfo ottenuto possono essere controllate dalle condizioni operative del processo, come ad esempio la concentrazione del mezzo di scambio, le caratteristiche della membrana, la temperatura, il pH.

Il metodo della presente invenzione è tipicamente condotto in un intervallo di temperature da circa 0 °C a circa 50 °C, preferibilmente da circa 4 °C a circa 30 °C, ad esempio a temperatura ambiente (20-25 °C).

In alcune realizzazioni, il contatto tra la soluzione di alimentazione e la membrana è statico.

In alcune realizzazioni, la soluzione di alimentazione fluisce tangenzialmente alla membrana, tipicamente in regime di flusso laminare.

- 5 In alcune realizzazioni, la soluzione di alimentazione viene pressata perpendicolarmente alla membrana in una configurazione *dead-end*.

Un apparato in grado di eseguire il metodo dell'invenzione è anch'esso un oggetto della presente invenzione. Detto apparato è caratterizzato da almeno una unità suddivisa in un primo compartimento e un secondo compartimento
10 per mezzo di una membrana, in cui detto primo compartimento comprende una miscela contenente detto farmaco biologico da purificare e detto secondo compartimento comprende un mezzo di scambio comprendente almeno un liquido o almeno un solido disciolto in un liquido o almeno un gas o loro miscele, o il vuoto, e in cui detta membrana è caratterizzata dall'essere in grado
15 di:

- (i) consentire il trasporto attraverso di essa di una o più sostanze presenti nella soluzione in cui è contenuto il farmaco biologico e/o nel mezzo di scambio, in maniera da ottenere la sovrassaturazione di detto farmaco biologico nella miscela in cui
20 esso è contenuto; e
- (ii) consentire la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico.

Detto apparato può anche comprendere più di una di dette unità in una configurazione in cui le varie unità possono essere alimentate da una medesima sorgente della miscela contenente il farmaco da purificare e una stessa sorgente del mezzo di scambio. Gli ingressi e le uscite delle varie unità
5 possono essere controllati e regolati da un processore, come un computer. L'apparato può inoltre comprendere uno o più dei seguenti elementi: un sistema di separazione liquido/solido per il recupero del materiale solido-cristallino; un sistema di riciclo delle fasi liquide nel serbatoio di alimentazione; un sistema per l'aggiunta di ulteriore soluzione di alimentazione per una operazione in
10 continuo; collegamenti dei serbatoi con bagni termostatici; pompe di ricircolo; sistemi di controllo per la verifica dei parametri di processo.

Una realizzazione esemplificativa di detto apparato è rappresentata in figura 1. Esso è composto da un serbatoio di alimentazione termostato 1, contenente la soluzione con il principio attivo che si vuole purificare o "*feed*"; una pompa di
15 ricircolo della soluzione di alimentazione 2; più moduli a membrana 3; un serbatoio contenente il mezzo di scambio termostato 4; una pompa per il ricircolo del mezzo di scambio 5; una linea di uscita del farmaco cristallizzato/precipitato 6; sistemi di controllo 7 per la verifica dei parametri di processo come, ad esempio, pressione, flusso, temperatura, analizzatore
20 spettrofotometrico della soluzione, gestiti da un computer 8; una pompa per aggiunta di ulteriore soluzione di alimentazione 9.

In alcune realizzazioni, il metodo della presente invenzione può essere realizzato in un singolo stadio o in più stadi allo scopo di aumentare progressivamente la purezza del prodotto biologico. In una realizzazione

esemplificativa, il prodotto solido ottenuto al termine del processo dell'invenzione viene sciolto in uno o più solventi idonei in modo da ottenere una miscela da utilizzare nuovamente nel passaggio a) del metodo dell'invenzione. Il metodo può quindi essere ripetuto una o più volte, separando
5 e ponendo in soluzione il prodotto solido ottenuto prima della successiva ripetizione.

Il metodo dell'invenzione può essere operato in modalità continua. In tale modalità al termine del passaggio e) dell'invenzione il metodo viene ripetuto sul prodotto solido, eventualmente ridisciolto, ottenuto al termine del passaggio e).
10 Il metodo può essere ripetuto fino all'ottenimento del grado di purificazione del farmaco desiderato o comunque fino a quando desiderato.

Il metodo dell'invenzione può inoltre comprendere uno o più dei seguenti passaggi, in qualunque ordine o combinazione, preferibilmente nell'ordine indicato:

- 15 (a') filtrazione e/o inattivazione di virus eventualmente presenti nella miscela contenente il farmaco biologico da purificare, mediante abbassamento del pH;
- (b') pretrattamento della miscela contenente il farmaco biologico da purificare al fine di ottenere una soluzione chiarificata e successiva rimozione del precipitato, se presente; detto pretrattamento può essere realizzato, ad
20 esempio, aggiungendo composti precipitanti come sopra descritto;
- (c') aggiustamento del pH o della forza ionica della miscela contenente il farmaco biologico da purificare su un valore appropriato e, facoltativamente,

introduzione di uno o più additivi per facilitare la cristallizzazione e/o la precipitazione, ad esempio gli additivi sopra descritti.

Preferibilmente detti passaggi a')-c') sono eseguiti prima di porre la miscela contenente il farmaco biologico da purificare in contatto con la membrana
5 secondo il passaggio a) del metodo.

In una realizzazione, la miscela contenente il farmaco da purificare è un surnatante di coltura cellulare chiarificato (CFCS) o un fluido di coltura cellulare (HCCF) e il metodo dell'invenzione comprende inoltre uno o più dei seguenti passaggi, anche in un ordine o combinazione diversi, antecedenti al passaggio
10 a) del metodo dell'invenzione:

(a'') concentrazione di detto CFCS o HCCF;

(b'') dialisi contro un tampone per ottenere un pH adeguato;

(c'') rimozione del prodotto solido formato nella fase (b''), se presente, per produrre un surnatante chiarificato;

15 (d'') facoltativamente, concentrazione del surnatante chiarificato;

(e'') facoltativamente, dialisi del surnatante chiarificato ottenuto nella fase (c'') o

(d'') contro un tampone appropriato per produrre una soluzione di alimentazione pretrattata.

Tutti questi passaggi possono essere eseguiti con le metodiche note nel
20 settore. In particolare la concentrazione e la dialisi possono essere eseguite come comunemente noto a seconda delle caratteristiche della soluzione.

In una realizzazione, il metodo comprende le seguenti fasi successive all'ottenimento del prodotto solido purificato (passaggio e):

(f) recuperare il prodotto solido cristallino e/o amorfo;

(g) dissolvere detto prodotto in un tampone e/o in un solvente adatto;

5 (h) sottoporre la soluzione ottenuta nella fase (g) a una o più fasi di cromatografia;

(i) facoltativamente concentrare l'eluato ottenuto nella fase (h).

Tutti questi passaggi possono essere eseguiti con le metodiche note nel settore. In particolare la dissoluzione, la cromatografia e la concentrazione
10 possono essere eseguite come comunemente noto a seconda delle caratteristiche del solido ottenuto.

In una realizzazione alternativa, il metodo comprende le seguenti fasi successive all'ottenimento del prodotto solido purificato:

(f') recuperare il prodotto solido cristallino e/o amorfo;

15 (g') dissolvere detto prodotto in un tampone e/o in un solvente adatto;

(h') sottoporre a filtrazione la soluzione ottenuta nella fase (g');

(i') facoltativamente concentrare il permeato o il retentato ottenuto nella fase (h').

Tutti questi passaggi possono essere eseguiti con le metodiche note nel
20 settore. In particolare la dissoluzione, la filtrazione e la concentrazione possono

essere eseguite come comunemente noto a seconda delle caratteristiche del solido ottenuto.

In una realizzazione, la miscela contenente il farmaco da purificare è un surnatante di coltura cellulare chiarificato (CFCS) o un fluido di coltura cellulare (HCCF) e il metodo comprende i seguenti passaggi:

- (i) facoltativamente concentrare detto CFCS o HCCF;
- (ii) dializzare detto CFCS o HCCF contro un tampone per ottenere un pH o una forza ionica adeguata;
- (iii) rimuovere il prodotto solido formato nella fase (ii), se presente, per produrre un surnatante chiarificato;
- (iv) facoltativamente, concentrare il surnatante chiarificato;
- (v) facoltativamente, dializzare il surnatante chiarificato ottenuto nella fase (iii) o (iv) contro un tampone appropriato per produrre una soluzione di alimentazione pretrattata;
- (vi) facoltativamente, filtrare e/o inattivare i virus eventualmente presenti nella miscela, mediante abbassamento del pH;
- (vii) rimuovere il precipitato dalla miscela pretrattata ottenuta nella fase (vi), se presente;
- (viii) aggiustare il pH o la forza ionica della miscela pretrattata ottenuta nella fase (vi) o (vii) su un valore appropriato e, facoltativamente, introdurre uno o più additivi per facilitare la cristallizzazione e/o la precipitazione;
- (ix) eseguire i passaggi a)-e) del metodo dell'invenzione;

(x) isolare il prodotto solido così ottenuto, ad esempio mediante centrifugazione o filtrazione.

I passaggi (i)-(viii) e (x) possono essere eseguiti con le metodiche note nel settore.

- 5 In alcune realizzazioni, il metodo dell'invenzione consente vantaggiosamente di ottenere un prodotto solido comprendente almeno circa il 50% del farmaco presente nella miscela impura iniziale.

Il metodo dell'invenzione può essere eseguito in modalità *batch*, *semi-batch*, continua o semi-continua.

- 10 Facoltativamente, i cristalli e/o il precipitato amorfo di farmaco biologico ottenuti al termine del metodo dell'invenzione possono essere miscelati con uno o più ingredienti e/o eccipienti per la stabilizzazione e la conservazione.

- Facoltativamente, i cristalli e/o il precipitato amorfo di farmaco biologico ottenuti al termine del metodo dell'invenzione possono essere miscelati con uno o più
15 ingredienti e/o eccipienti per ottenere composizioni, ad esempio composizioni farmaceutiche.

Dette composizioni farmaceutiche possono assumere qualsiasi forma come, ad esempio: liquidi, capsule, emulsioni, granuli, pellicole, impianti, soluzioni liquide, supposte, sospensioni multiparticelle, solidi, compresse, polveri.

- 20 Le composizioni possono anche essere preparate in forma liofilizzata. Altre forme possono anche essere adatte, come sarebbe compreso da un esperto nella tecnica.

Le composizioni possono anche essere preparate usando uno o più vettori farmaceuticamente accettabili prima della somministrazione ad un soggetto. Un vettore farmaceuticamente accettabile è una sostanza che sostiene il rilascio della composizione somministrata e/o migliora la selettività e/o l'efficacia e/o la
5 sicurezza di la composizione somministrata, senza causare effetti indesiderati o effetti collaterali avversi o senza interagire in modo deleterio con uno qualsiasi degli altri componenti di una data composizione in cui esso è contenuto. Esempi di vettori farmaceuticamente accettabili sono acqua sterile, soluzioni saline, soluzioni tampone, soluzione di destrosio, polimeri.

10 Farmaci biologici purificati ottenuti con il metodo dell'invenzione e/o loro composizioni possono essere usati per trattare varie malattie, incluso ma non limitato a patologie oncologiche e non.

Farmaci biologici purificati ottenuti con il metodo dell'invenzione e/o loro composizioni possono essere utilizzati nella ricerca per investigare proteine e/o
15 funzione/espressione di acido nucleico in cellule, tessuti e simili in vivo e/o in vitro; interi anticorpi e/o loro frammenti possono anche essere coniugati con marcatori e/o una porzione citotossica.

Altri usi per gli farmaci biologici ottenuti come descritto nella presente invenzione sono anche contemplati come sarebbero facilmente riscontrabili da
20 un esperto del ramo.

Rientra anche nell'invenzione un kit per l'implementazione del metodo dell'invenzione. Detto kit per la purificazione, almeno parziale, di almeno un farmaco biologico comprende le componenti necessarie per preparare la

miscela contenente il farmaco biologico da purificare e il mezzo di scambio, almeno una membrana o modulo a membrana e istruzioni per l'esecuzione del metodo, in cui detta membrana è caratterizzata dall'essere in grado di:

- 5 (i) consentire il trasporto attraverso di essa di una o più sostanze presenti nella soluzione in cui è contenuto il farmaco biologico e/o nel mezzo di scambio, in maniera da ottenere la sovrassaturazione di detto farmaco biologico nella miscela in cui esso è contenuto; e
- 10 (ii) consentire la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico.

Il kit può inoltre contenere eventuali altri elementi utili all'esecuzione del metodo, come additivi o strumenti.

15 Il metodo dell'invenzione è stato vantaggiosamente utilizzato per la purificazione di un anticorpo monoclonale (mAb) intero anti-CD20 dal surnatante di colture cellulari, in varie condizioni sperimentali, ottenendo sempre una resa maggiore del 50%, una elevata purezza (>90% in monomero) e cristalli di anti-CD20 suscettibili di conservazione a lungo termine.

L'invenzione verrà ora qui di seguito illustrata da esempi.

Esempi

20 **Esempio 1**

Cristallizzazione di un anticorpo monoclonale (mAb) intero dal surnatante di colture cellulari mediante una membrana di polipropilene (PP) non funzionalizzata.

È stato sorprendentemente scoperto che il mAb intero anti-CD20 può essere
5 cristallizzato e/o precipitato direttamente dal surnatante di coltura cellulare
chiarificato. Questo surnatante è stato inizialmente analizzato mediante
cromatografia ad esclusione di dimensioni (SEC) e verificato che conteneva
molte impurezze.

Un campione di 26 mL di surnatante di coltura cellulare di anti-CD20 (soluzione
10 anti-CD20 4,9 mg/mL a pH 8,5) è stato sottoposto a inattivazione virale
aggiungendo goccia a goccia acido acetico 1 M (pH 2,4) fino a pH 3,5 e
mantenuto per 60 min a temperatura ambiente (TA) sotto delicata agitazione.
La soluzione surnatante è stata separata dal precipitato, costituito
principalmente da HCP (proteine cellulari) e DNA, mediante centrifugazione a
15 5000 RPM a 8 °C per 20 min. Una soluzione tampone di TRIS-HCl 1 M è stata
aggiunta sotto agitazione fino a raggiungere un pH finale di 5,6 e mantenuta a
temperatura ambiente sotto agitazione per 60 min. Successivamente, la
soluzione è stata concentrata mediante membrana da ultrafiltrazione da 30 kDa
(Nadir PM UC030 RC) in modalità dead-end applicando una pressione di 4 bar
20 (cella agitata Sterlitech™ HP4750, pressurizzata con azoto). Lo scambio del
tampone contro HEPES 100 mM a pH 7,7 è stato quindi eseguito mediante
centrifugazione (unità di filtraggio centrifuga Amicon Ultra-15 con membrana
Ultracel-10) a 6500 RPM 8 °C per 30 minuti. Il surnatante concentrato risultante
è stato quindi concentrato a 2,5 mL mediante centrifugazione (unità di filtraggio

centrifuga Amicon Ultra-15 con membrana Ultracel-10) a 6500 RPM 8 °C per 30 minuti. Questo "raccolto pretrattato 1" aveva una concentrazione di anti-CD20 di 30-33 g/L di anti-CD20 (misurata mediante spettrofotometria UV-Vis).

Una "soluzione precipitante" contenente 9,6% V/V PEG 400 e 0,98 M Na₂SO₄ in tampone HEPES è stata quindi miscelata in rapporto di volume 1:1 con il "raccolto pretrattato 1". La cristallizzazione è stata eseguita in un sistema di cristallizzazione a membrana dinamico a 20 °C e portata di circolazione della soluzione di alimentazione di 0,5 mL/min, con un mezzo di scambio costituito da una soluzione acquosa di MgCl₂ 14 wt.%. L'esperimento è stato eseguito fino a quando il solvente rimosso dalla soluzione di alimentazione era tale che le concentrazioni finali fossero: 12% V/V PEG 400 e 1,17 M Na₂SO₄ in tampone HEPES 0,1 M a pH 7,7, secondo le condizioni di cristallizzazione di Rituximab riportate in [Yang *et al. Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery*. PNAS 100, 6934–6939 (2003)].

FIGURA 1 mostra il sistema a membrana utilizzato, inclusa una membrana commerciale non funzionalizzata in polipropilene mostrata in FIGURA 2 (Accurel PP 2E HF (R/P), con dimensione media dei pori 0,2 µm). FIGURA 3 mostra cristalli di anti-CD20 ottenuti da una soluzione di alimentazione preparata miscelando 2,5 mL di "raccolto pretrattato 1" e 2,5 mL di soluzione precipitante. I primi cristalli sono comparsi dopo circa 24-36 ore e l'esperimento è stato interrotto dopo 48 ore. I cristalli sono stati separati mediante centrifugazione (10 min, 14000 RPM, TA) e sciolti in 1 mL di tampone HEPES da 100 mM a pH 7,7. La concentrazione proteica della soluzione cristallina

disciolta era 31,7 g/L di anti-CD20. La resa è stata del 58,5%. L'analisi SEC ha mostrato un'elevata purezza del 94,3% in monomero.

La dissoluzione dei cristalli anti-CD20 è avvenuta rapidamente. La cristallizzazione non ha portato ad aggregati. In breve, circa 30 mg di cristalli di anti-CD20 sono stati sospesi in 1 mL di HEPES 0,1 M pH 7,7 e agitati a 20 °C. I
5 cristalli si sono sciolti entro 5 minuti, producendo una soluzione contenente 35 g/L di anti-CD20. L'analisi (Dynamic Light Scattering) dei cristalli non ha mostrato alcun aumento di sottoprodotti o prodotti di degradazione dopo la cristallizzazione, mostrando un singolo picco acuto a 10,28 nm.

10 La conservazione a lungo termine è stata simulata conservando i cristalli anti-CD20 per un mese a 20 °C dopo aver rimosso il liquido mediante centrifugazione. Come controllo liquido, sono stati anche conservati 70 g/L di anti-CD20 in HEPES 100 mM (pH 7,7). L'analisi SEC ha indicato lo 0,5% di aggregati e l'1,5% di frammenti nella formulazione liquida. I cristalli di controllo
15 avevano solo lo 0,3% di aggregati e l'1,4% di frammenti. Questi test indicano che i cristalli anti-CD20 sono suscettibili di conservazione a lungo termine (cioè sono stabili).

Esempio 2

*Cristallizzazione di un anticorpo monoclonale (mAb) intero dal surnatante di
20 colture cellulari mediante una membrana di polivinilidene fluoruro (PVDF) funzionalizzata.*

È stato sorprendentemente scoperto che il mAb intero anti-CD20 può essere cristallizzato e/o precipitato direttamente dal surnatante di coltura cellulare

chiarificato. Questo surnatante è stato inizialmente analizzato mediante cromatografia ad esclusione di dimensioni (SEC) e verificato che conteneva molte impurezze.

Un campione da 26 mL di surnatante di coltura cellulare di anti-CD20 (soluzione anti-CD20 4,9 mg/mL a pH 8,5) è stato sottoposto a inattivazione virale aggiungendo goccia a goccia acido acetico 1 M (pH 2,4) fino a pH 3,5 e mantenuto per 60 min a temperatura ambiente (TA) sotto delicata agitazione. La soluzione surnatante è stata separata dal precipitato, costituito principalmente da HCP (proteine cellulari) e DNA, mediante centrifugazione a 5000 RPM a 8 °C per 20 min. Una soluzione tampone di TRIS-HCl 1 M è stata aggiunta sotto agitazione fino a raggiungere un pH finale di 5,6 e mantenuta a temperatura ambiente sotto agitazione per 60 min. Successivamente, la soluzione è stata concentrata mediante membrana da ultrafiltrazione da 30 kDa (Nadir PM UC030 RC) in modalità dead-end applicando una pressione di 4 bar (cella agitata SterlitechTM HP4750, pressurizzata con azoto). Lo scambio del tampone contro HEPES 100 mM a pH 7,7 è stato quindi eseguito mediante centrifugazione (unità di filtraggio centrifuga Amicon Ultra-15 con membrana Ultracel-10) a 6500 RPM 8 °C per 30 minuti. Il surnatante concentrato risultante è stato quindi concentrato a 2,5 mL mediante centrifugazione (unità di filtraggio centrifuga Amicon Ultra-15 con membrana Ultracel-10) a 6500 RPM 8 °C per 30 minuti. Questo "raccolto pretrattato 1" aveva una concentrazione di anti-CD20 di 30-33 g/L di anti-CD20 (misurata mediante spettrofotometria UV-Vis).

Una "soluzione precipitante" contenente 9,6% V/V PEG 400 e 0,98 M Na₂SO₄ in tampone HEPES è stata quindi miscelata in rapporto di volume 1:1 con il

“raccolto pretrattato 1”. La cristallizzazione è stata eseguita in un sistema di cristallizzazione a membrana dinamico a 20 °C e portata di circolazione della soluzione di alimentazione di 0,5 mL/min, con un mezzo di scambio costituito da una soluzione acquosa di MgCl₂ 14 wt.%. L'esperimento è stato eseguito
5 fino a quando il solvente rimosso dalla soluzione di alimentazione era tale che le concentrazioni finali fossero: 12% V/V PEG 400 e 1,17 M Na₂SO₄ in tampone HEPES 0,1 M a pH 7,7, secondo le condizioni di cristallizzazione di Rituximab riportate in [Yang *et al.* *Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery*. PNAS 100, 6934–6939 (2003)].

10 FIGURA 1 mostra il sistema a membrana utilizzato, inclusa una membrana commerciale porosa di fluoruro di polivinilidene (PVDF) (dimensione media dei pori 0,2 µm) funzionalizzata con un sottile strato di alcol polivinilico (PVA) reticolato con glutaraldeide (GA).

In breve, le membrane in PVDF sono state modificate depositando una
15 soluzione acquosa contenente in proporzione PVA : glutaraldeide : HCl = 5 g : 0,5 mL : 0,5 mL in 44,5 mL di acqua. PVA e glutaraldeide sono stati sciolti separatamente in 20 mL di acqua deionizzata calda. Quindi, le soluzioni di PVA e glutaraldeide sono state miscelate con acqua deionizzata seguita
20 dall'aggiunta goccia a goccia di acido cloridrico sotto agitazione a temperatura ambiente. Infine, la soluzione è stata rapidamente depositata su membrane PVDF, in modo da formare uno strato di gel omogeneo a seguito di solidificazione spontanea in circa 18 ore.

I cristalli sono stati ottenuti da una soluzione di alimentazione preparata miscelando 2,5 mL di “raccolto 1 pretrattato” e 2,5 mL di “soluzione precipitante”. I primi cristalli sono comparsi dopo circa 24-36 ore e l'esperimento è stato interrotto dopo 48 ore. I cristalli sono stati separati mediante
5 centrifugazione (10 min, 14000 RPM, TA) e sciolti in 1 mL di tampone HEPES da 100 mM a pH 7,7. La concentrazione proteica della soluzione cristallina disciolta era di 13,8 g/L di anti-CD20. La resa è stata del 62.5%. L'analisi SEC ha mostrato un'elevata purezza del 92,2% in monomero.

La dissoluzione dei cristalli anti-CD20 è avvenuta rapidamente. La
10 cristallizzazione non ha portato ad aggregati. In breve, circa 30 mg di cristalli di anti-CD20 sono stati sospesi in 1 mL di HEPES 0,1 M pH 7,7 e agitati a 20 °C. I cristalli si sono sciolti entro 5 minuti, producendo una soluzione contenente 35 g/L di anti-CD20. L'analisi (Dynamic Light Scattering) dei cristalli non ha mostrato alcun aumento di sottoprodotti o prodotti di degradazione dopo la
15 cristallizzazione, mostrando un singolo picco acuto a 10,34 nm.

La conservazione a lungo termine è stata simulata conservando i cristalli anti-CD20 per un mese a 20 °C dopo aver rimosso il liquido mediante centrifugazione. Come controllo liquido, sono stati anche conservati 70 g/L di anti-CD20 in HEPES 100 mM (pH 7,7). L'analisi SEC ha indicato lo 0,5% di
20 aggregati e l'1,5% di frammenti nella formulazione liquida. I cristalli di controllo avevano solo lo 0,3% di aggregati e l'1,4% di frammenti. Questi test indicano che i cristalli anti-CD20 sono suscettibili di conservazione a lungo termine (cioè sono stabili).

Esempio 3

Cristallizzazione di un anticorpo monoclonale (mAb) intero dal surnatante di colture cellulari mediante una membrana di polivinilidene fluoruro (PVDF) funzionalizzata e ad una più alta concentrazione del mezzo di scambio.

- 5 È stato sorprendentemente scoperto che il mAb intero anti-CD20 può essere cristallizzato e/o precipitato direttamente dal surnatante di coltura cellulare chiarificato. Questo surnatante è stato inizialmente analizzato mediante cromatografia ad esclusione di dimensioni (SEC) e verificato che conteneva molte impurezze.
- 10 Un campione da 26 mL di surnatante di coltura cellulare di anti-CD20 (soluzione anti-CD20 4,9 mg/mL a pH 8,5) è stato sottoposto a inattivazione virale aggiungendo goccia a goccia acido acetico 1 M (pH 2,4) fino a pH 3,5 e mantenuto per 60 min a temperatura ambiente (TA) sotto delicata agitazione. La soluzione surnatante è stata separata dal precipitato, costituito
- 15 principalmente da HCP (proteine cellulari) e DNA, mediante centrifugazione a 5000 RPM a 8 °C per 20 min. Una soluzione tampone di TRIS-HCl 1 M è stata aggiunta sotto agitazione fino a raggiungere un pH finale di 5,6 e mantenuta a temperatura ambiente sotto agitazione per 60 min. Successivamente, la soluzione è stata concentrata mediante membrana da ultrafiltrazione da 30 kDa
- 20 (Nadir PM UC030 RC) in modalità dead-end applicando una pressione di 4 bar (cella agitata Sterlitech™ HP4750, pressurizzata con azoto). Lo scambio del tampone contro HEPES 100 mM a pH 7,7 è stato quindi eseguito mediante centrifugazione (unità di filtraggio centrifuga Amicon Ultra-15 con membrana

Ultracel-10) a 6500 RPM 8 °C per 30 minuti. Il surnatante concentrato risultante è stato quindi concentrato a 2,5 mL mediante centrifugazione (unità di filtraggio centrifuga Amicon Ultra-15 con membrana Ultracel-10) a 6500 RPM 8 °C per 30 minuti. Questo "raccolto pretrattato 1" aveva una concentrazione di anti-CD20
5 di 30-33 g/L di anti-CD20 (misurata mediante spettrofotometria UV-Vis).

Una "soluzione precipitante" contenente 9,6% V/V PEG 400 e 0,98 M Na₂SO₄ in tampone HEPES è stata quindi miscelata in rapporto di volume 1:1 con il "raccolto pretrattato 1". La cristallizzazione è stata eseguita in un sistema di cristallizzazione a membrana dinamico a 20 °C e portata di circolazione della
10 soluzione di alimentazione di 0,5 mL/min, con un mezzo di scambio costituito da MgCl₂ 22 wt.%. L'esperimento è stato eseguito fino a quando il solvente rimosso dalla soluzione di alimentazione era tale che le concentrazioni finali fossero: 12% V/V PEG 400 e 1,17 M Na₂SO₄ in tampone HEPES 0,1 M a pH 7,7, secondo le condizioni di cristallizzazione di Rituximab riportate in [Yang *et al.* *Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery*. PNAS 100,
15 6934–6939 (2003)].

Il sistema a membrana utilizzato per la cristallizzazione includeva una membrana commerciale porosa di fluoruro di polivinilidene (PVDF) (dimensione media dei pori 0,2 µm) funzionalizzata con un sottile strato di alcol polivinilico (PVA) reticolato con glutaraldeide (GA).
20

In breve, le membrane in PVDF sono state modificate depositando una soluzione acquosa contenente in proporzione PVA : glutaraldeide : HCl = 5 g : 0,5 mL : 0,5 mL in 44,5 mL di acqua. PVA e glutaraldeide sono stati sciolti

separatamente in 20 mL di acqua deionizzata calda. Quindi, le soluzioni di PVA e glutaraldeide sono state miscelate con acqua deionizzata seguita dall'aggiunta goccia a goccia di acido cloridrico sotto agitazione a temperatura ambiente. Infine, la soluzione è stata rapidamente depositata su membrane PVDF, in modo da formare uno strato di gel omogeneo a seguito di solidificazione spontanea in circa 18 ore.

I cristalli sono stati ottenuti da una soluzione di alimentazione preparata miscelando 2,5 mL di "raccolto 1 pretrattato" e 2,5 mL di "soluzione precipitante". I primi cristalli sono comparsi dopo circa 12-24 ore e l'esperimento è stato interrotto dopo 36 ore. I cristalli sono stati separati mediante centrifugazione (10 min, 14000 RPM, TA) e sciolti in 1 mL di tampone HEPES da 100 mM a pH 7,7. La concentrazione proteica della soluzione cristallina disciolta era di 21,4 g/L di anti-CD20. La resa è stata del 68.7%. L'analisi SEC ha mostrato un'elevata purezza del 94,2% in monomero.

La dissoluzione dei cristalli anti-CD20 è avvenuta rapidamente. La cristallizzazione non ha portato ad aggregati. In breve, circa 30 mg di cristalli di anti-CD20 sono stati sospesi in 1 mL di HEPES 0,1 M pH 7,7 e agitati a 20 °C. I cristalli si sono sciolti entro 5 minuti, producendo una soluzione contenente 35 g/L di anti-CD20. L'analisi (Dynamic Light Scattering) dei cristalli mostrata in FIGURA 4 (B) non ha mostrato alcun aumento di sottoprodotti o prodotti di degradazione dopo la cristallizzazione, mostrando un singolo picco acuto a 10,67 nm, a differenza del grafico DLS ampio mostrato in FIGURA 4 (A) in riferimento alla soluzione di alimentazione prima dell'implementazione del metodo.

La conservazione a lungo termine è stata simulata conservando i cristalli anti-CD20 per un mese a 20 °C dopo aver rimosso il liquido mediante centrifugazione. Come controllo liquido, sono stati anche conservati 70 g/L di anti-CD20 in HEPES 100 mM (pH 7,7). L'analisi SEC ha indicato lo 0,5% di aggregati e l'1,4% di frammenti nella formulazione liquida. I cristalli di controllo avevano solo lo 0,3% di aggregati e l'1,4% di frammenti. Questi test indicano che i cristalli anti-CD20 sono suscettibili di conservazione a lungo termine (cioè sono stabili).

Esempio 4

10 *Cristallizzazione di un anticorpo monoclonale (mAb) intero dal surnatante di colture cellulari parzialmente purificato mediante una membrana di polipropilene (PP) non funzionalizzata.*

L'anti-CD20 è stato prima parzialmente purificato dal surnatante della coltura cellulare in modo convenzionale (*depth filtration* seguita da cromatografia per affinità a proteina A), seguito dall'inattivazione virale aggiungendo goccia a goccia acido acetico 1 M (pH 2,4) fino a pH 3,5 e mantenuto per 60 min a temperatura ambiente (TA) sotto delicata agitazione. Una soluzione tampone di TRIS-HCl 1 M è stata aggiunta sotto agitazione fino a raggiungere un pH finale di 5,6 e mantenuta a temperatura ambiente sotto agitazione per 60 min.

20 Successivamente, la soluzione è stata concentrata mediante membrana da ultrafiltrazione da 30 kDa (Nadir PM UC030 RC) in modalità dead-end applicando una pressione di 4 bar (cella agitata Sterlitech™ HP4750, pressurizzata con azoto).

Un campione da 9 mL di anti-CD20 inattivato da virus (6,8 mg/mL di soluzione anti-CD20 a pH 5,6) è stato sottoposto allo scambio di tampone contro HEPES 100 mM a pH 7,7 mediante centrifugazione (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit con Ultracel-10) a 7500 RPM 8 °C per 25 minuti e quindi concentrato a 2,5
5 mL mediante centrifugazione (unità di filtraggio centrifuga Amicon Ultra-15 con membrana Ultracel-10) a 7500 RPM 8 °C per 25 minuti. Questa soluzione "parzialmente purificata" aveva una concentrazione di anti-CD20 di 26,8 g/L di anti-CD20 (misurata mediante spettrofotometria UV-Vis).

Una "soluzione precipitante" contenente 9,6% V/V PEG 400 e 0,98 M Na₂SO₄
10 in tampone HEPES è stata quindi miscelata in rapporto di volume 1:1 con la soluzione anti-CD20 "parzialmente purificata" e inattivata da virus. La cristallizzazione è stata eseguita in un sistema di cristallizzazione a membrana dinamico mostrato in FIGURA 1 a 20 °C e portata di circolazione della soluzione di alimentazione di 0,5 mL/min, con un mezzo di scambio costituito
15 da MgCl₂ 14 wt.%. Nell'esperimento è stata utilizzata una membrana commerciale in polipropilene porosa non funzionalizzata (Accurel PP 2E HF (R/P), mostrata in FIGURA 2, con dimensione media dei pori 0,2 µm). L'esperimento è stato eseguito fino a quando il solvente rimosso dalla soluzione di alimentazione era tale che le concentrazioni finali fossero: 12% V/V PEG 400
20 e 1,17 M Na₂SO₄ in tampone HEPES 0,1 M a pH 7,7, secondo le condizioni di cristallizzazione di Rituximab riportate in [Yang *et al. Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery*. PNAS 100, 6934–6939 (2003)].

I primi cristalli sono comparsi dopo circa 24-36 ore e l'esperimento è stato interrotto dopo 48 ore. Dopo la prima cristallizzazione, i cristalli sono stati sciolti

e ricristallizzati o lavati in tampone HEPES 100 mM pH 7,7. I cristalli sono stati separati mediante centrifugazione (10 min, 14000 RPM, TA) e sciolti in 1 mL di tampone HEPES da 100 mM a pH 7,7. La concentrazione proteica della soluzione cristallina disciolta era 19,8 g/L di anti-CD20. La resa è stata del
5 78,7%. L'analisi SEC ha mostrato un'elevata purezza del 96,3% in monomero.

Sebbene la presente invenzione sia stata descritta in termini di configurazioni preferite, resta inteso che variazioni e modifiche o configurazioni alternative possano essere apportate dagli esperti nel settore. Pertanto, è inteso che le
10 rivendicazioni allegate coprono possibili variazioni equivalenti che rientrano nell'ambito dell'invenzione per come rivendicato.

RIVENDICAZIONI

1. Un metodo per la purificazione, totale o parziale, di uno o più farmaci biologici, o loro frammenti, da una miscela, comprendente i seguenti passaggi:
- 5 (a) porre detta miscela contenente detto farmaco biologico da purificare a contatto con una membrana;
- (b) porre un mezzo di scambio comprendente almeno un liquido o almeno un solido disciolto in un liquido o almeno un gas o loro miscele, a contatto con detta membrana, oppure applicare il vuoto, sul lato opposto
10 rispetto a detta miscela contenente il farmaco biologico;
- (c) ottenere la sovrassaturazione di detto farmaco biologico nella miscela in cui esso è contenuto per mezzo di detta membrana;
- (d) ottenere la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico, completamente o in parte, per mezzo di detta membrana;
- 15 (e) raccogliere il prodotto solido formatosi per mezzo della membrana e comprendente detto farmaco biologico;
- in cui detta membrana è caratterizzata dall'essere in grado di:
- (i) consentire il trasporto attraverso di essa di una o più sostanze presenti in detta miscela in cui è contenuto il farmaco biologico e/o
20 in detto mezzo di scambio in maniera da ottenere la sovrassaturazione di detto farmaco biologico nella miscela in cui esso è contenuto; e

- (ii) consentire la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico.
2. Il metodo secondo la rivendicazione 1 in cui detto farmaco biologico è scelto fra: anticorpo, frammento di anticorpo, anticorpo bispecifico, anticorpo monoclonale, anticorpo policlonale, anticorpo coniugato, vaccino, componente del sangue, allergene, proteina terapeutica ricombinante, polipeptide, proteina di fusione, ormone, prodotto utilizzato in una terapia cellulare e/o genica e un farmaco biosimilare.
3. Il metodo secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui detto farmaco biologico è un anticorpo monoclonale, o un suo frammento.
4. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti in cui detta miscela contenente detto farmaco biologico da purificare comprende un surnatante di coltura cellulare chiarificato (CFCS) o un brodo di coltura cellulare (HCCF).
5. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta miscela contenente detto farmaco biologico da purificare comprende una soluzione impura o parzialmente o totalmente purificata di detto farmaco biologico.
6. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta miscela contenente detto farmaco biologico da purificare prima di essere utilizzata nel passaggio a) di detto metodo viene concentrata di un fattore >1 .

7. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta miscela contenente detto farmaco biologico da purificare prima di essere utilizzata nel passaggio a) di detto metodo viene sottoposta ad uno scambio di tampone.
- 5 8. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta miscela contenente detto farmaco biologico da purificare comprende ulteriormente uno o più composti precipitanti.
9. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta miscela contenente detto farmaco biologico da purificare
10 comprende ulteriormente uno o più additivi in grado di facilitare la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico.
10. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detto mezzo di scambio è un non-solvente per detto farmaco biologico.
11. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti in cui
15 detto mezzo di scambio è un liquido scelto fra acqua, metanolo, etanolo, propanolo, acetone, etere dietilico, esano, pentano, liquidi ionici, glicole etilenico e loro miscele.
12. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detto mezzo di scambio è una miscela di almeno un liquido e almeno un
20 solido solubile disciolto in concentrazione compresa tra 1% e 50%.
13. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detto mezzo di scambio è una miscela di almeno un liquido e almeno un polielettrolita.

14. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detto mezzo di scambio è una miscela gassosa, ad esempio aria, o un gas inerte, ad esempio N₂.
- 5 15. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta membrana è porosa o densa o almeno uno dei suoi strati è poroso o denso.
- 10 16. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta membrana ha un carattere idrofilo o idrofobo, o almeno uno dei suoi strati ha un carattere idrofilo o idrofobo oppure la membrana comprende aree idrofiliche alternate con aree idrofobiche.
- 15 17. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta membrana è composta da un materiale organico o inorganico o misto.
18. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta membrana è in uno o più materiali scelti fra: polimeri, zeoliti, silica, allumina, metalli e leghe.
19. Il metodo secondo la rivendicazione 18 in cui detto polimero è scelto fra polipropilene, polietilene, politetrafluoroetilene, polivinilidene fluoruro, polisulfone, poliimmide, poliammide, chitosano e alginato.
- 20 20. Il metodo secondo la rivendicazione 19, in cui detta membrana è in polivinilidene fluoruro in cui sono dispersi in maniera omogenea particelle di silica mesoporosa.

21. Il metodo secondo la rivendicazione 19, in cui detta membrana è una membrana porosa di fluoruro di polivinilidene (PVDF) funzionalizzata con alcol polivinilico reticolato con glutaraldeide.
22. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui
5 detta membrana, o almeno uno dei suoi strati, è caricata elettricamente mediante gruppi funzionali ionizzabili.
23. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta membrana o almeno uno dei suoi strati è elettricamente conduttivo e/o magneticamente responsivo.
- 10 24. Il metodo della rivendicazione 23 in cui detta membrana elettricamente conduttiva è composta da polimeri intrinsecamente conduttori, oppure rivestita con materiali elettricamente conduttivi, ad esempio mediante deposizione chimica in fase vapore (CVD), deposizione fisica in fase vapore (PVD) o rivestimento.
- 15 25. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta membrana è funzionalizzata con uno o più ricognitori molecolari scelti fra antigeni naturali o sintetici in grado di legarsi in modo specifico con detto farmaco biologico, anticorpi naturali o sintetici o loro frammenti capaci di uno specifico riconoscimento geometrico, aminoacidi,
20 polipeptidi, polimeri a stampo molecolare, polisaccaridi lineari o ciclici, composti naturali o sintetici adatti a dare origine a interazioni idrofobiche, di tipo “chiave-serratura”, ioniche e riconoscimento di dimensioni.

26. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta membrana o almeno uno dei suoi strati comprende almeno un riempitivo microporoso e/o mesoporoso e/o macroporoso e/o un materiale a struttura gerarchica, come zeoliti, metal organic frameworks (MOF), materiali bidimensionali (2D), grafene, ossido di grafene, nanotubi di carbonio, silica.
27. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta membrana è in grado di rimuovere parzialmente almeno un solvente da detta miscela comprendente detto farmaco biologico aumentando così la concentrazione di detto farmaco al di sopra della saturazione.
28. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta membrana è in grado di aggiungere almeno un non-solvente a detta miscela comprendente detto farmaco biologico riducendo così la solubilità di detto farmaco.
29. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui nel passaggio c) la sovrasaturazione di detto farmaco biologico nella miscela in cui esso è contenuto è ottenuta mediante il trasporto di massa di una o più sostanze scambiate attraverso detta membrana.
30. Il metodo secondo la rivendicazione 29 in cui detto trasporto di massa è promosso da una differenza di pressione parziale del solvente o del non-solvente e/o di attività del solvente o del non-solvente e/o di temperatura e/o di pressione idraulica e/o di pressione osmotica e/o di potenziale

elettrochimico fra detta miscela contenente detto farmaco biologico da purificare e detto mezzo di scambio, a contatto con opposti lati della membrana.

5 31. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui la sovrasaturazione di detto farmaco biologico nella soluzione in cui esso è contenuto avviene in presenza di un campo elettrico e/o magnetico applicato a detta membrana.

10 32. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta membrana promuove la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico.

15 33. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta membrana consente la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico mediante interazioni specifiche promosse dalla membrana stessa, o da almeno uno dei suoi strati, con detto farmaco biologico da purificare.

20 34. Il metodo secondo la rivendicazione 33 in cui detta membrana è in grado di promuovere dette interazioni specifiche che consentono la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico mediante proprietà fisico-chimiche intrinseche dell'intera membrana o di almeno uno dei suoi strati.

35. Il metodo secondo la rivendicazione 33 in cui detta membrana è in grado di promuovere interazioni specifiche che consentono la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico mediante modifiche e/o

funzionalizzazione dell'intera membrana o di almeno uno dei suoi strati con uno o più ricognitori molecolari.

- 5 36. Il metodo secondo la rivendicazione 33 in cui detta membrana è in grado di promuovere interazioni specifiche che consentono la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico all'interfaccia o all'interno dei pori della membrana stessa mediante proprietà morfologiche intrinseche determinate da dimensione dei pori e/o forma dei pori e/o porosità e/o rugosità della membrana stessa o di almeno uno dei suoi strati.
- 10 37. Il metodo secondo la rivendicazione 33 in cui detta membrana in grado di promuovere interazioni specifiche che consentono la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico è una membrana a scambio ionico o una membrana elettricamente conduttiva e/o magneticamente responsiva.
- 15 38. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti in cui detta membrana è in forma piana, tubolare, fibra cava, fibra cava ritorta, fibra cava a più fori o capillare.
- 20 39. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta membrana è inserita in un modulo, in un alloggiamento o in altro apposito contenitore.
40. Il metodo secondo la rivendicazione 39, in cui detto modulo ha forma a cella a flusso tangenziale, "*plate and frame*", "*dead end*", spirale avvolta o a tubo.

41. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, che viene operato in modalità discontinua o continua.
42. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, che viene operato in modalità continua sul prodotto solido ottenuto al termine del passaggio e), eventualmente ridisciolto.
43. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, che comprende inoltre uno o più dei seguenti passaggi antecedenti il passaggio a):
- (a') filtrazione e/o inattivazione di virus eventualmente presenti nella miscela contenente il farmaco biologico da purificare, mediante abbassamento del pH;
- (b') pretrattamento della miscela contenente il farmaco biologico da purificare al fine di ottenere una soluzione chiarificata e successiva rimozione del precipitato, se presente;
- (c') aggiustamento del pH o della forza ionica della miscela contenente il farmaco biologico da purificare su un valore appropriato e, facoltativamente, introduzione di uno o più additivi per facilitare la cristallizzazione e/o la precipitazione.
44. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta miscela contenente il farmaco da purificare è un surnatante di coltura cellulare chiarificato (CFCS) o un fluido di coltura cellulare (HCCF) e il metodo comprende inoltre uno o più dei seguenti passaggi antecedenti al passaggio a) del metodo dell'invenzione:

- (a'') concentrazione di detto surnatante di coltura cellulare chiarificato (CFCS) o fluido di coltura cellulare (HCCF);
- (b'') dialisi contro un tampone per ottenere un pH adeguato;
- (c'') rimozione del prodotto solido formato nella fase (b''), se presente, per produrre un surnatante chiarificato;
- 5 (d'') facoltativamente, concentrazione del surnatante chiarificato;
- (e'') facoltativamente, dialisi del surnatante chiarificato ottenuto nella fase (c'') o (d'') contro un tampone appropriato per produrre una miscela pretrattata.
- 10 45. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, che comprende le seguenti fasi successive all'ottenimento del prodotto solido purificato nel passaggio e):
- (f) recuperare il prodotto solido cristallino e/o amorfo;
- (g) dissolvere detto prodotto in un tampone e/o in un solvente adatto;
- 15 (h) sottoporre la soluzione ottenuta nella fase (g) a uno o più fasi di cromatografia;
- (i) facoltativamente concentrare l'eluato ottenuto nella fase (h).
46. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni 1-44, che comprende le seguenti fasi successive all'ottenimento del prodotto solido purificato nel passaggio e):
- 20 (f) recuperare il prodotto solido cristallino e/o amorfo;

(g') dissolvere detto prodotto in un tampone e/o in un solvente adatto;

(h') sottoporre a filtrazione la soluzione ottenuta nella fase (g');

(i') facoltativamente concentrare il permeato o il retentato ottenuto nella fase (h').

5 47. Il metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detta miscela contenente il farmaco da purificare è un surnatante di coltura cellulare chiarificato (CFCS) o un fluido di coltura cellulare (HCCF) e il metodo comprende i seguenti passaggi:

10 (i) facoltativamente concentrare detto surnatante di coltura cellulare chiarificato (CFCS) o fluido di coltura cellulare (HCCF);

(ii) dializzare detto surnatante di coltura cellulare chiarificato (CFCS) o fluido di coltura cellulare (HCCF) contro un tampone per ottenere un pH adeguato;

15 (iii) rimuovere il prodotto solido formato nella fase (ii), se presente, per produrre un surnatante chiarificato;

(iv) facoltativamente, concentrare il surnatante chiarificato;

(v) facoltativamente, dializzare il surnatante chiarificato ottenuto nella fase (iii) o (iv) contro un tampone appropriato per produrre una miscela pretrattata;

20 (vi) facoltativamente, filtrare e/o inattivare i virus eventualmente presenti nella miscela, mediante abbassamento del pH;

(vii) rimuovere il precipitato dalla miscela pretrattata ottenuta nella fase (vi), se presente;

(viii) aggiustare il pH o la forza ionica della miscela pretrattata ottenuta nella fase (vi) o (vii) su un valore appropriato e, facoltativamente, introdurre uno o più additivi per facilitare la cristallizzazione e/o la precipitazione;

(ix) eseguire i passaggi a)-e) del metodo delle rivendicazioni 1-40;

(x) isolare il prodotto solido così ottenuto.

48. Un apparato in grado di eseguire il metodo delle rivendicazioni 1-47 caratterizzato da almeno una unità suddivisa in un primo compartimento e un secondo compartimento per mezzo di una membrana, in cui detto primo compartimento comprende una miscela contenente detto farmaco biologico da purificare e detto secondo compartimento comprende un mezzo di scambio comprendente almeno un liquido o almeno un solido disciolto in un liquido o almeno un gas o loro miscele, o il vuoto, e in cui detta membrana è caratterizzata dall'essere in grado di:

(i) consentire il trasporto attraverso di essa di una o più sostanze presenti nella soluzione in cui è contenuto il farmaco biologico e/o nel mezzo di scambio, in maniera da ottenere la sovrassaturazione di detto farmaco biologico nella miscela in cui esso è contenuto; e

(ii) consentire la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto farmaco biologico.

49. Un kit per la purificazione, almeno parziale, di almeno un farmaco biologico secondo il metodo delle rivendicazioni 1-47 comprendente le componenti necessarie per preparare detta miscela contenente il farmaco biologico da purificare e detto mezzo di scambio, almeno una
5 membrana o modulo a membrana e istruzioni per l'esecuzione del metodo, in cui detta membrana è caratterizzata dall'essere in grado di:
- (i) consentire il trasporto attraverso di essa di una o più sostanze presenti nella soluzione in cui è contenuto il farmaco biologico e/o nel mezzo di scambio, in maniera da ottenere la
10 sovrassaturazione di detto farmaco biologico nella miscela in cui esso è contenuto; e
 - (ii) consentire la cristallizzazione e/o la precipitazione di detto
farmaco biologico.

15

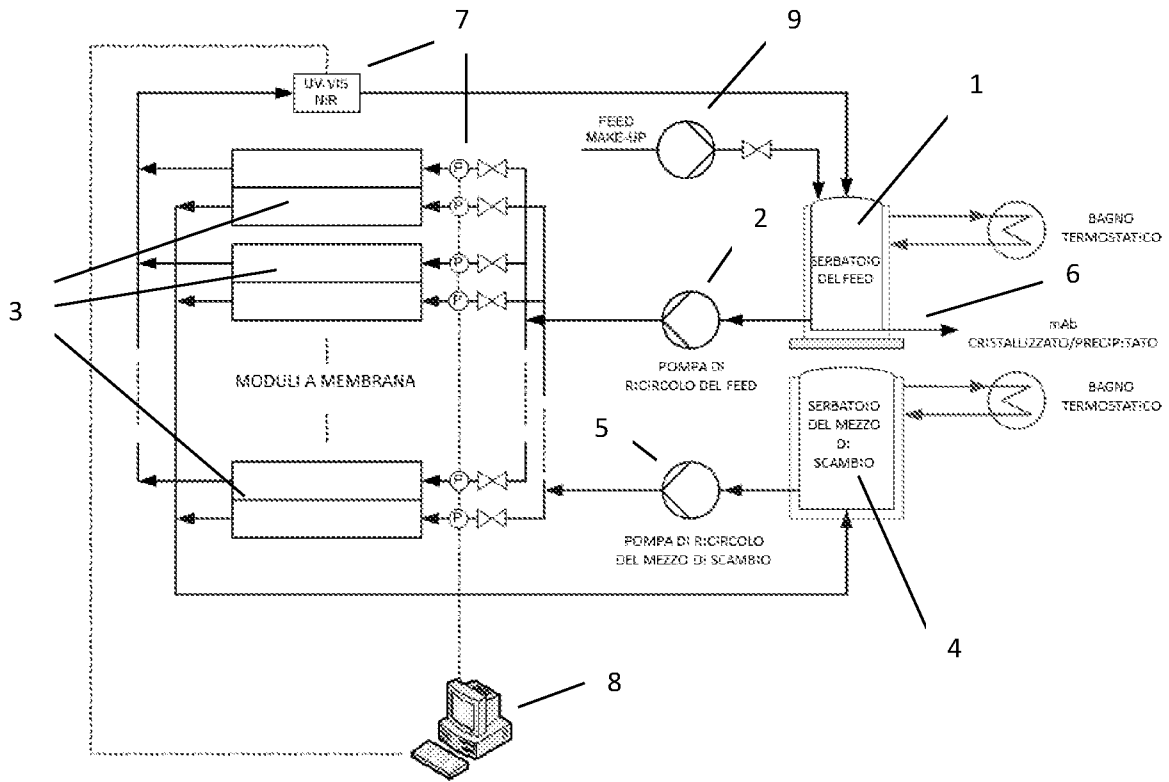


FIGURA 1

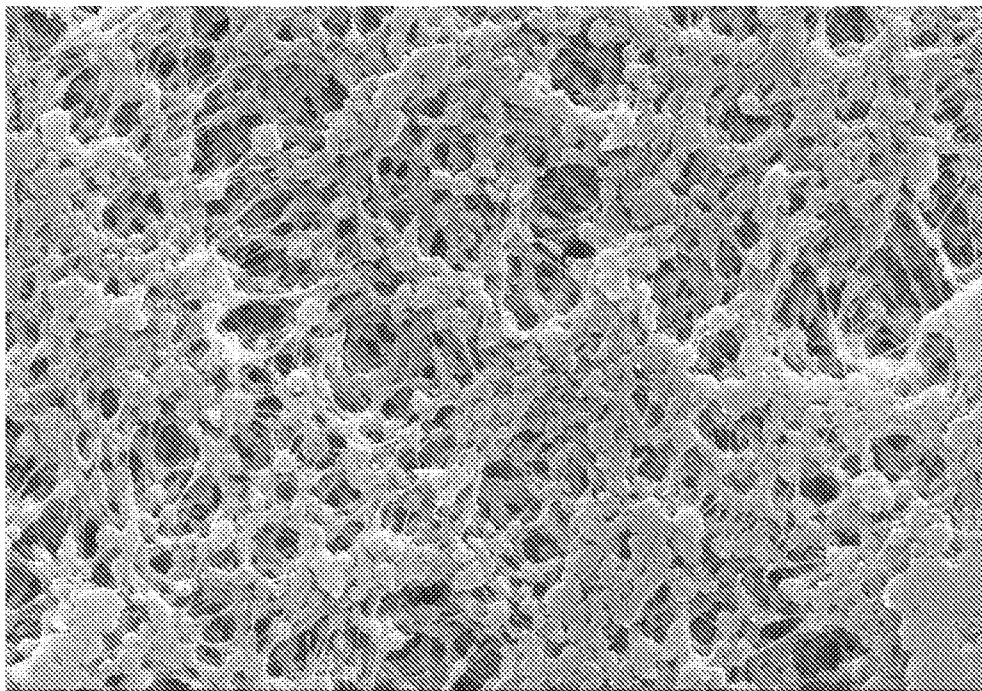


FIGURA 2

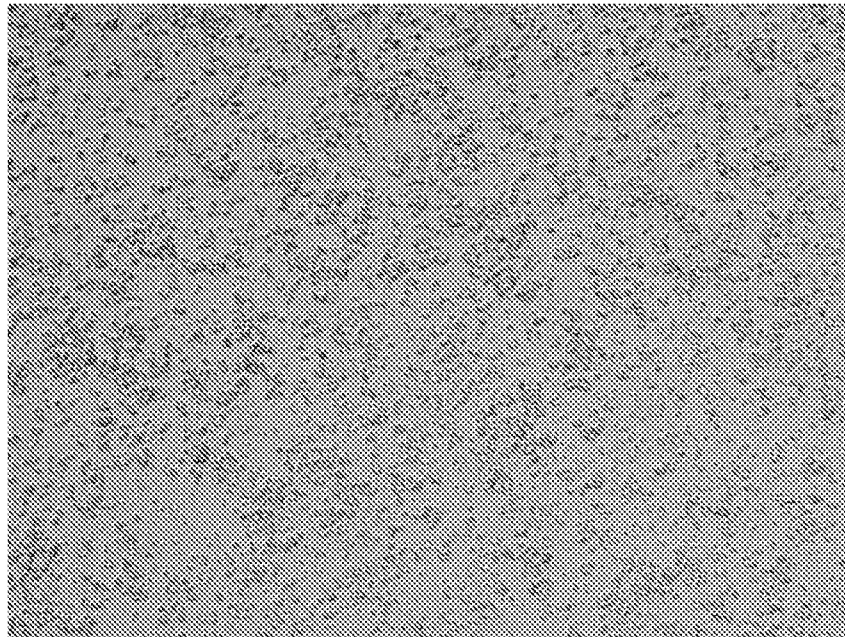


FIGURA 3

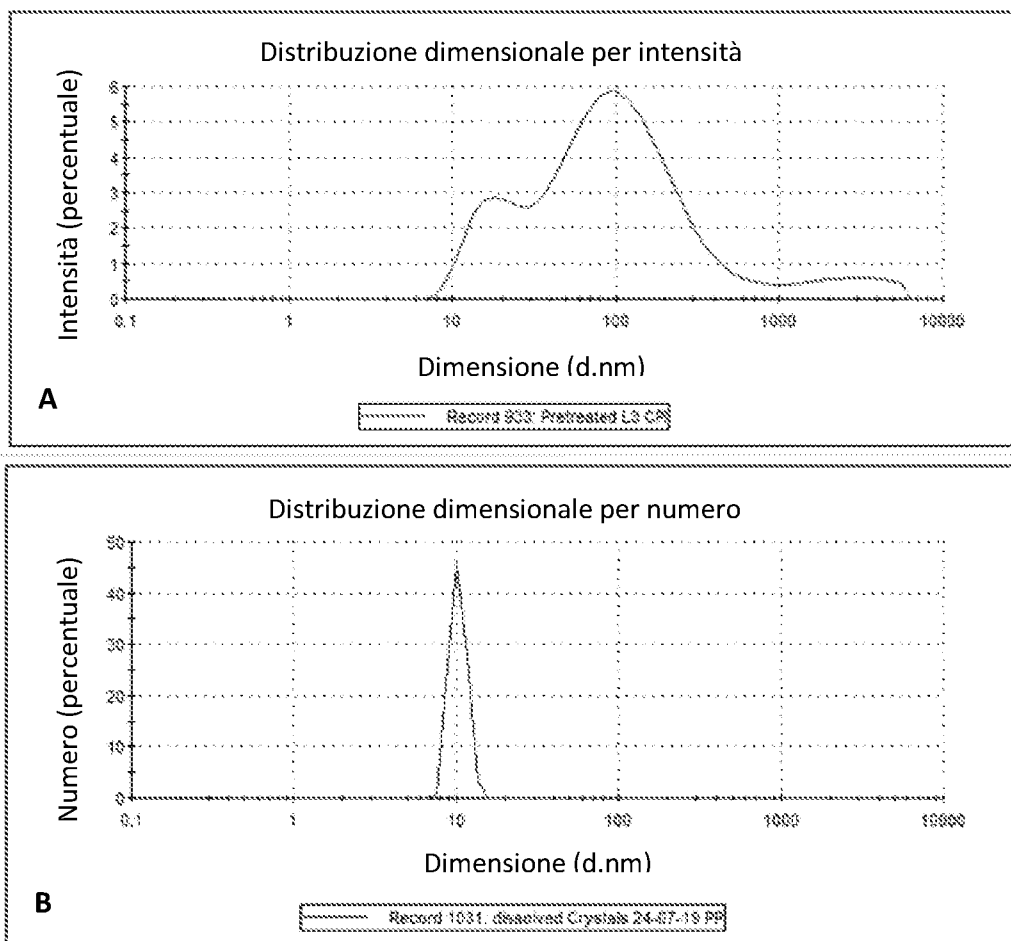


FIGURA 4