

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 780**

51 Int. Cl.:
C12M 1/12 (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08774069 .2**
96 Fecha de presentación: **11.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2171034**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2010**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE UN BIOPOLÍMERO (P.E. UN POLIPÉPTIDO) EN UN PROCESO DE FERMENTACIÓN CONTINUO.**

30 Prioridad:
13.06.2007 EP 07110227

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.03.2012

73 Titular/es:
**CMC BIOLOGICS A/S
VANDTAARNSVEJ 83
2860 SOEBORG (COPENHAGEN), DK**

72 Inventor/es:
LAUSTSEN, MADS

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 375 780 T3

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

DESCRIPCION

un procedimiento para producir un biopolímero (por ejemplo un polipéptido) en un proceso de fermentación en continuo

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere a un procedimiento para mejorar la productividad en fermentaciones microbianas y reactores biológicos de cultivo celular de mamíferos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Tradicionalmente, las células de mamíferos, así como las células bacterianas, se cultivan principalmente como cultivos en suspensión en reactores biológicos, que se llaman también fermentadores. Las condiciones del entorno pueden controlarse de manera precisa en tales recipientes. Un medio de agitación mueve el medio de cultivo en el interior del reactor y proporciona de esta manera una distribución homogénea de las células.

15

[0003] El suministro de nutrientes a las células y la eliminación de materiales de desecho tienen lugar, en el caso de cultivos líquidos en suspensión en reactores biológicos, de acuerdo con uno de los siguientes procedimientos:

20

En una operación por lote, el reactor funciona de forma discontinua. Al comienzo de un lote, el medio de cultivo normalmente contiene un medio con los nutrientes necesarios, por ejemplo glucosa, vitaminas, aminoácidos y minerales. Durante la fermentación, estos se consumen, de tal manera que el medio se vuelve cada vez más pobre en nutrientes. Al mismo tiempo, la concentración de productos de desecho aumenta, lo que finalmente da como resultado una detención del crecimiento celular. La densidad celular viable alcanza un valor máximo y después desciende de nuevo. En consecuencia, el cultivo se interrumpe normalmente cuando se alcanza la densidad celular máxima o se alcanza una viabilidad celular mínima. El contenido del reactor se pasa después para procesamiento corriente abajo adicional.

25

[0004] Un procedimiento por lote podría mejorarse renovando repetidamente el medio de cultivo sin eliminar por ello las células. Sin embargo, para este fin, debe añadirse un medio recién preparado al cultivo celular durante la fermentación o como alternativa una parte del medio de cultivo debe eliminarse repetidamente incluso aunque no se haya consumido en absoluto. Este procedimiento es caro porque especialmente el medio de cultivo de las células de mamífero es difícil de desarrollar y de producir y en consecuencia es caro. En este sentido, el llamado "procedimiento semi-continuo" (llamado como alternativa procedimiento de lote alimentado) es un procedimiento en el que, durante el procedimiento de fermentación, el medio de cultivo recién preparado no se suministra en su totalidad sino que sólo se suministran los nutrientes consumidos. Sin embargo, en la práctica este procedimiento no proporciona ninguna ventaja sustancial debido a un aumento de los materiales de desecho que conduce a un recorrido característico de la densidad celular durante el procedimiento de cultivo de manera similar a la del caso del procedimiento puramente en lote.

35

40

[0005] El tercer procedimiento es el procedimiento continuo. En este, las condiciones del entorno pueden ajustarse uniformemente de tal manera que las células puedan crecer de manera óptima. Sin embargo, el procedimiento es muy laborioso y caro porque el medio de cultivo debe suministrarse y eliminarse de forma continua (con células y producto). Además, también en el caso de este procedimiento, no se ha alcanzado una densidad celular sustancialmente mayor que en el caso de los procedimientos mencionados anteriormente porque las células también se eliminan continuamente del reactor con la fuga del medio de cultivo celular.

45

[0006] Un ejemplo de un procedimiento continuo especial, es el llamado procedimiento de perfusión. En los procedimientos de cultivo por perfusión de la técnica anterior, los desechos o impurezas en el medio se eliminan continuamente del cultivo (se retienen las células más el producto en el biorreactor) y el medio desplazado se repone con medio recién preparado. La adición constante de medio recién preparado y la eliminación de productos de desecho proporciona a las células el entorno que requieren para conseguir concentraciones altas de células y con ello mayor productividad. De esta forma, es posible conseguir un estado de equilibrio en el que se mantengan la concentración celular y la productividad. El producto debe recogerse continuamente retirando medio (con células y producto) o mediante una así llamada purga.

55

[0007] En resumen, en un procedimiento continuo el biorreactor muchas veces no comprende un filtro que permita eliminar las impurezas mientras retiene las células y compuestos de alto peso molecular (por ejemplo, producto) en el biorreactor. En un procedimiento continuo de perfusión el biorreactor comprende un filtro para eliminar impurezas mientras retiene las células y el producto o un filtro que sólo retiene las células, es decir, tanto producto como impurezas pasan a través del filtro. Dicho en otras palabras, los reactores biológicos de la técnica anterior comprenden sólo un filtro.

60

[0008] El documento US 6544424 describe un sistema de filtración para fluidos biológicos creando un flujo

65

tangencial alternativo (FTA) de fluido a través de un elemento de filtro en el que los fluidos de desecho pueden eliminarse del medio por filtración y puede añadirse fluido recién preparado para reponer el fluido filtrado. En el contexto actual esto puede verse como un ejemplo de un reactor con un filtro que permite eliminar impurezas mientras retiene células y compuestos de alto peso molecular (por ejemplo, producto) en el biorreactor.

5

[0009] En la figura 1 en la presente memoria, puede verse un reactor de la técnica anterior como un reactor con una sola unidad de filtrado UF para eliminar las impurezas o solo el filtro para eliminar producto e impurezas, es decir, un reactor que no comprende ambos filtros, mostrados en la figura 1. En otras palabras, el reactor descrito en, por ejemplo, el documento US 6544424 carece de la posibilidad de recoger productos biológicos de alto peso molecular de un filtro (filtro de producto) a una velocidad de efluente adecuada eliminando simultáneamente impurezas del recipiente de cultivo usando un segundo filtro (filtro de impurezas) a una velocidad de efluente adecuada.

[0010] Los siguientes documentos de la técnica anterior:

15

- Documento EP 270905A
- Stark *et al.*, Advances in biochemical Engineering/ Biotechnology 2003 vol. 80, 149-175;
- Linardos *et al.*, Biotechnology and Bioengineering 1992, vol. 39, 504-510
- Poertner *et al.*, Applied Microbiology and Biotechnology, 1998 vol. 50, 403-414

20

esencialmente describen reactores anteriores y sistemas de eliminación de impurezas como se ha abordado anteriormente y se ilustra en la figura 1, es decir, los reactores de la técnica anterior que carecen de la posibilidad de recoger productos biológicos de alto peso molecular de un filtro (filtro de producto) a una velocidad de efluente adecuada eliminando simultáneamente impurezas del recipiente de cultivo usando un segundo filtro (filtro de impurezas) a una velocidad de efluente adecuada.

25

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

[0011] El problema a solucionar por la presente invención es proporcionar un procedimiento continuo (por ejemplo, un procedimiento de perfusión continuo) para aumentar la productividad de un biorreactor, en el que la productividad de un biopolímero (por ejemplo, un polipéptido) puede mejorarse debido a, por ejemplo, una densidad celular aumentada en el reactor y en particular una concentración significativamente mayor de biopolímero de interés en el medio recogido.

[0012] La solución se basa en que el presente inventor ha descubierto que teniendo una unidad de filtrado de impurezas con base de membrana (por ejemplo, ultrafiltración) y un módulo de recogida de producto diferente acoplado en un biorreactor puede aumentar la densidad celular en el reactor durante un procedimiento continuo y en particular puede conseguirse una concentración significativamente mayor de biopolímero de interés en el medio de recogida. El módulo de recogida de producto podría tener una unidad de filtrado con base de membrana (por ejemplo, ultrafiltración). En tal caso el módulo de recogida de producto se denomina en la presente memoria filtro de producto.

35

[0013] Como se ilustra en la figura 1 en la presente memoria, la solución de la presente invención, que se refiere a un procedimiento para regular independientemente la eliminación de impurezas y recogida de productos es una solución en la que el biorreactor comprende una unidad de filtrado para permitir eliminar impurezas mientras retienen las células y productos en el biorreactor y un módulo de recogida de producto (por ejemplo, un filtro de producto) para permitir la eliminación de producto e impurezas mientras se retienen las células en el biorreactor.

45

Los expertos en la materia conocen varios filtros de membrana adecuados (para más detalles véase a continuación).

50

[0014] Además, las dos unidades de filtrado independientes, por ejemplo, pueden regularse de tal manera que pueden pasar tasas adecuadas de líquido a través de cada unidad de filtrado reduciendo así el volumen recogido. Esto brinda la posibilidad de recoger productos biológicos de alto peso molecular a una velocidad de flujo adecuada mientras se eliminan impurezas del recipiente de cultivo usando una velocidad de flujo diferente, adecuada y de este modo la densidad celular y el rendimiento de producto puede aumentar drásticamente.

55

[0015] Esto se ilustra en los ejemplos de trabajo 1 y 3 en la presente memoria. En el ejemplo de trabajo 3 no funciona ningún filtro de impurezas. En la etapa 3 del ejemplo 1 se usan dos filtros de acuerdo con la invención, como se describe en la presente memoria. Un filtro de impurezas y un filtro de producto. Esto proporciona una mejora significativa en comparación con el ejemplo 3, ya que se consigue un aumento en la densidad celular de aproximadamente 45 millones de células/ml a una densidad celular de aproximadamente 60 millones de células/ml y en particular una acumulación de producto de aproximadamente 425 mg/l a aproximadamente 850 mg/l en la corriente de recogida, cuando el efluente del medio se ha separado a través de dos unidades de filtrado (filtro de impurezas y filtro de producto). De esta manera, el producto se concentra de aproximadamente 425 mg/l detectados en el biorreactor en el ejemplo 3 a aproximadamente 850 mg/l obtenidos en la corriente de recogida de producto del

65

ejemplo 1. Sin limitarse a la teoría, se cree que una razón para que se consiga un incremento en la densidad celular en el ejemplo 1 en comparación con el experimento de control en el ejemplo 3 (sin usar un filtro de impurezas) es que se pierde menos cantidad de factores de crecimiento, hormonas y citocinas, tales como IGF, hidrocortisona e insulina (recombinante) del biorreactor. Esto se debe a que el filtro de impurezas se selecciona con un tamaño de
5 poro tal que estos compuestos no pueden pasar fácilmente el filtro y de esta manera, se retienen en el interior del biorreactor mejorando por lo tanto la viabilidad de las células.

Los resultados y conclusiones de los ejemplos 1 a 3 se han confirmado en los ejemplos de trabajo 4 a 5.

10 **[0016]** En consecuencia, un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para producir un biopolímero de interés en un procedimiento continuo de fermentación por perfusión, en el que el biorreactor comprende una unidad de filtrado de impurezas y un módulo de recogida de producto caracterizado por que:

- 15 (i) la unidad de filtrado de impurezas permite eliminar impurezas con un PM inferior al PM del biopolímero de interés mientras se retienen células y el biopolímero de interés en el biorreactor (llamado "filtro de impurezas"); y
(ii) el módulo de recogida de producto permite eliminar el biopolímero de interés e impurezas mientras se retienen células en el biorreactor (llamado "módulo de recogida de impurezas");

20 en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- (a) fermentar células que expresan el biopolímero de interés en el biorreactor en un medio adecuado en condiciones adecuadas;
(b) durante la fermentación, se eliminan impurezas mediante el filtro de impurezas;
25 (c) durante la fermentación se recoge el biopolímero de interés mediante el módulo de recogida de impurezas;
(d) durante la fermentación se añade nuevo medio para reponer los nutrientes consumidos por las células y para equilibrar el medio eliminado durante las etapas (b) y (c); y
(e) el biopolímero de interés se aísla del medio de recogida;

30 en el que la densidad celular en el biorreactor durante la fermentación alcanza al menos 10 millones de células por ml de medio, y

en el que se eliminan impurezas a través del filtro de impurezas mediante un caudal a través del filtro de impurezas
35 de la etapa (b) que es al menos 25 % del caudal a través del módulo de recogida de producto de la etapa (c).

DEFINICIONES:

40 **[0017]** Previo al análisis de las realizaciones detalladas de la invención se proporciona una definición de términos específicos relacionados con los principales aspectos y realizaciones de la invención. Todos los términos se definen de acuerdo con el entendimiento normal de los términos por los expertos en la materia.

45 **[0018]** La expresión cultivo de células por "perfusión" se refiere a que durante el cultivo se retienen células por un dispositivo de separación (por ejemplo, un filtro de membrana) en el que hay un efluente de líquido (que comprende, por ejemplo impurezas) y en el que hay un flujo de entrada del medio de cultivo celular normalmente a través de una entrada independiente conectada al biorreactor.

[0019] A continuación se describen realizaciones de la presente invención, solo a modo de ejemplos.

50 FIGURAS

[0020]

Figura 1: Esta figura muestra un ejemplo de un nuevo biorreactor como se describe en la presente memoria. En el
55 lado izquierdo hay un "filtro de impurezas" (UF - elimina impurezas de bajo PM, por debajo 10.000 PM) y en el lado derecho hay un "filtro de producto" (MF - recogida de producto).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIONBiopolímero de interés

5 **[0021]** Los biopolímeros son una clase especial de polímeros producida por los organismos vivos. Los biopolímeros, están formados por unidades repetitivas llamadas monómeros. Los biopolímeros tienen de forma inherente una estructura bien definida: La composición química exacta y la secuencia en la que se disponen estas unidades se llama estructura primaria. Muchos biopolímeros se pliegan espontáneamente en formas características compactas, que determinan sus funciones biológicas. El almidón, proteínas y péptidos, ADN, y ARN son todos
10 ejemplos de biopolímeros, en los que las unidades monoméricas, respectivamente, son azúcares, amino ácidos, y ácidos nucleicos.

[0022] En un ejemplo adecuado el biopolímero de interés tiene un PM de al menos 2.000 kDa, al menos 5.000 kDa, al menos 15.000 kDa, al menos 25.000 kDa, o al menos 50.000 kDa.

15 **[0023]** Los ejemplos adecuados de un biopolímero de interés incluyen un polipéptido, polisacárido, híbrido de polipéptido/polisacárido, polinucleótido, que son polímeros derivados de ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN), polihidroxibutirato, una clase de poliésteres producidos por algunas bacterias, cis-1,4-poliisopreno el componente principal del látex del árbol del caucho.

20 **[0024]** En una realización preferida el biopolímero es un polipéptido de interés.

Polipéptido de interés

25 **[0025]** En principio cualquier polipéptido de interés puede producirse como se describe en la presente memoria.

[0026] Sin embargo, en un ejemplo adecuado el polipéptido de interés tiene un PM de al menos 5.000 kDa, al menos 15.000 kDa, al menos 20.000 kDa o al menos 40.000 kDa.

30 **[0027]** Los ejemplos adecuados de un polipéptido de interés incluyen un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, hormona de crecimiento humana, hormona de estimulación del folículo, Factor VIII, eritropoyetina (EPO), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), alfa-galactosidasa A, alfa-L-iduronidasa (rhIDU; laronidasa), N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (rhASB; galsulfasa), ADNasa, Activador de plasminógeno tisular (APT), Glucocerebrosidasa, Interferón (IF), Insulina, derivado de insulina, factor de crecimiento de tipo insulina 1,
35 Tenecteplasa, factor antihemofílico, factor de coagulación humana, Etanercept, Trastuzumab, Infliximab, Basiliximab, Daclizumab o Glucocerebrosidasa.

Biorreactor

40 **[0028]** La expresión "biorreactor" se refiere a cualquier dispositivo o sistema que mantiene un entorno biológicamente activo. En un caso, pero sin limitación, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un procedimiento químico que implica organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de estos organismos. Este procedimiento puede ser tanto aeróbico como anaeróbico. Los reactores biológicos normalmente son cilíndricos, variando en tamaño desde algunos litros a metros cúbicos, y normalmente se fabrican de acero
45 inoxidable pero también pueden fabricarse de otros materiales tales como materiales desechables.

Un biorreactor puede también referirse a un dispositivo o sistema empleado para hacer crecer células o tejidos en el contexto de cultivo celular. Basándose en el modo de operación, un biorreactor puede clasificarse como por lote, lote alimentado o continuo (por ejemplo, un modelo de reactor continuo de tanque agitado). Un ejemplo de un biorreactor
50 es el quimiostato. El biorreactor puede estar equipado con una o más entradas para suministrar medio nuevo recién preparado o concentrado a las células y una o más salidas para recoger producto o vaciar el biorreactor. Adicionalmente, el biorreactor puede estar equipado con una o más salidas construidas de tal manera que pueden acoplarse unidades de filtrado al biorreactor.

55 **[0029]** En una realización preferida el biorreactor tiene un volumen de al menos 50 l, más preferentemente al menos 100 l, incluso más preferentemente al menos 250 l y lo más preferentemente al menos 500 l.

Módulo de recogida de impurezas

60 **[0030]** Un elemento crítico en un sistema de cultivo por perfusión como se describe en la presente memoria es el separador célula/medio (llamado en la presente memoria módulo de recogida de productos). En general hay dos clases principales de técnicas para la separación de células del medio en reactores biológicos de perfusión, es decir, mediante sedimentación centrífuga o gravitacional, y mediante filtración (por ejemplo, filtración tangencial tal como filtración por rotación axial o como filtros de centrifugación o filtración de flujo cruzado).

65

[0031] En una realización el módulo de recogida de productos es un dispositivo de separación basado en sedimentación centrífuga o gravitacional. Muchos de estos dispositivos de sedimentación se conocen en la técnica (véase por ejemplo el documento US 5342781).

[0032] En una realización preferida el módulo de recogida de productos es una unidad de filtrado. En tal caso, puede llamarse filtro de producto en la presente memoria.

Unidades de filtrado de producto e impurezas

[0033] Se han desarrollado varios filtros especializados y procedimientos de filtración para separar materiales de acuerdo con sus propiedades físicas y químicas. Los filtros, que se han desarrollado en la técnica, incluyen filtros de superficie plana, filtros plegados, módulos de unidades múltiples, y formas tubulares tales como fibras huecas. Para la invención descrita en la presente memoria puede aplicarse cualquier sistema de tecnología de ultrafiltración siempre que se pueda asegurar la esterilidad. Son ejemplos de sistemas de filtración aplicables para su uso en la producción de polipéptidos y eliminación de impurezas como se describe en la presente memoria sistemas como: sistemas de cartucho, placa y cuadro y sistemas de fibra hueca. Los sistemas pueden funcionar bombeando líquido sobre la membrana, mediante vibración (como la que suministra PallSep) o alternando flujo tangencial (FTA) y ambas membranas, polimérica y cerámica son muy adecuadas para el procedimiento de filtración. Un experto en la materia conoce como seleccionar una membrana con las características correctas.

[0034] Las membranas de fibra hueca se han empleado de manera satisfactoria en una amplia diversidad de industrias, incluyendo, alimentación, zumos, industria farmacéutica, metalúrgica, lechera, vinícola, y más recientemente, agua potable local. Dependiendo de la aplicación, las membranas de fibra hueca pueden ser alternativas muy prácticas y rentables a los procedimientos de separación física y química convencionales. Las membranas de fibra hueca ofrecen los beneficios exclusivos de altas densidades de empaquetamiento de membrana, diseños sanitarios y, debido a su integridad estructural y construcción, pueden soportar contrapresiones de permeación permitiendo así flexibilidad en el diseño y funcionamiento del sistema. Los cartuchos de fibra hueca pueden funcionar desde el interior hacia el exterior durante la filtración. Esto significa que el fluido del procedimiento (retenido) fluye a través del centro de la fibra hueca y el permeado pasa a través de la pared de la fibra al exterior de la fibra de membrana. El flujo tangencial puede ayudar a limitar la contaminación de la membrana. Otras técnicas de funcionamiento que pueden emplearse con sistemas de membrana de fibra hueca incluyen enjuague posterior con permeado y flujo inverso de retenido.

[0035] En consecuencia, el filtro puede ubicarse en un módulo de filtración externo unido al biorreactor. Como alternativa tanto el filtro de impurezas como el filtro de producto pueden ubicarse dentro del biorreactor. Las unidades de filtrado pueden también contener bombas o sistemas para prevenir la contaminación del filtro tales como el sistema ATF descrito anteriormente o el sistema Pallsep en el que la oscilación horizontal controlada mueve los elementos de la membrana a través del fluido de alimentación. La oscilación genera energía vibratoria en la superficie de la membrana, proporcionando una escisión (mayor que la generada típicamente en sistemas de filtración de flujo tangencial convencionales) que se limita a una pequeña capa límite por encima de la superficie de la membrana, y que no se aplica a la masa del fluido. Esto asegura que incluso en corrientes de alimentación de sólidos grandes, las membranas no se apelmazan con las especies retenidas. Los fluidos se procesan de una manera muy suave a través de un paso de flujo abierto con caída de presión mínima e incluso distribución de presión transmembrana.

[0036] El sistema puede depender de los metabolitos que se necesita eliminar del procedimiento y que el producto en cuestión esté equipado con membranas con un valor de punto de corte molecular de pocos cientos a decenas de miles. Con frecuencia se usan membranas con un punto de corte entre 1.000 y 20.000. El beneficio de usar una membrana con un punto de corte de 10.000 o inferior, preferentemente de aproximadamente 5.000, es que factores de crecimiento como insulina e IGF-1 se retendrán en el biorreactor.

[0037] Además, durante un funcionamiento prolongado, se puede cambiar un filtro y reesterilizar el sistema sin detener la fermentación.

[0038] Los expertos en la materia conocen cual podría ser un tipo de filtro adecuado para eliminar impurezas y recoger el producto y un tamaño de poro con un punto de corte de peso molecular nominal de membrana (NMWC) adecuado con respecto a permitir que perfundan impurezas fuera del filtro de impurezas y recoger el polipéptido de interés a través del filtro de producto.

[0039] No obstante, el filtro de impurezas con frecuencia se selecciona dentro del intervalo de 2.000 a 30.000 NMWC, tal como por ejemplo en el intervalo de 2.000 a 20.000 NMWC o en el intervalo de 2.000 a 15.000 NMWC. Generalmente hablando se prefiere que el filtro de impurezas tenga una separación menor de 20.000 NMWC).

[0040] El filtro de producto con frecuencia se selecciona dentro del intervalo de 50.000 NMWC a 2 μm o de 100.000 NMWC a 1 μm .

[0041] Como saben los expertos en la materia, un punto de corte de filtro de producto adecuado en la presente memoria dependerá del tamaño, por ejemplo, del polipéptido de interés. Si es, por ejemplo, Eritropoyetina (EPO) que

tiene un PM de aproximadamente 30 kDa entonces un punto de corte de filtro de producto adecuado podría ser 50.000 NMWC. Sin embargo, incluso para una proteína tal como EPO se usaría normalmente un valor de punto de corte mayor tal como por ejemplo 500.000 NMWC ya que a este valor de punto de corte se seguirán manteniendo células hospedadoras de producción convencional en el medio del biorreactor.

5

En una realización preferida el filtro de producto tiene un tamaño de poro de punto de corte de peso molecular (NMWC) de al menos 1,5 veces el PM del biopolímero (por ejemplo, polipéptido) de interés. Por ejemplo si el PM del polipéptido de interés es de 100.000, el punto de corte preferido del filtro de producto es al menos 150.000 NMWC. Incluso más preferentemente, el filtro de producto tiene un tamaño de poro de punto de corte de peso molecular (NMWC) de al menos 2 veces el PM del polipéptido de interés.

10

[0042] En una realización preferida el filtro de impurezas tiene un tamaño de poro de punto de corte de peso molecular (NMWC) de un máximo de 80 % del PM del biopolímero (por ejemplo polipéptido) de interés. Por ejemplo si el PM del polipéptido de interés es de 100.000, el punto de corte máximo preferido del filtro de impurezas es de 80.000 NMWC. Incluso más preferentemente, el filtro de impurezas tiene un tamaño de poro de punto de corte de peso molecular (NMWC) de un máximo de 50 % del PM del polipéptido de interés.

15

[0043] Puede ser una ventaja que el NMWC del filtro de impurezas sea relativamente bajo si el medio comprende compuestos útiles tales como por ejemplo insulina, que tiene un PM de aproximadamente 6 kDa. En consecuencia, si por ejemplo la insulina está presente en el medio el NMWC del filtro de impurezas es preferentemente 10.000 o menor.

20

[0044] En la ilustración ejemplar en la figura 1 están las dos unidades de filtrado diferentes, por ejemplo basadas en membrana situadas en dos aparatos de soporte de filtro separados físicamente. También podría estar en un aparato de soporte de filtro, en el que se podría cambiar el valor del punto de corte del filtro de membrana de acuerdo a si se usará como filtro de impurezas o filtro de producto en el procedimiento de producción del polipéptido como se describe en la presente memoria. Preferentemente, están las dos unidades de filtrado basadas en membrana diferentes situadas en dos aparatos de soporte de filtro separados físicamente.

25

30 Fermentación de células en un medio adecuado en las condiciones adecuadas

[0045] Los expertos en la materia conocen cual podría ser el medio adecuado y las condiciones adecuadas con respecto a células de expresión específica y polipéptido de interés.

35

[0046] El término "medio" generalmente se refiere a un medio de cultivo celular, que puede comprender sales, aminoácidos, vitaminas, lípidos, detergentes, tampones, factores de crecimiento, hormonas, citocinas, elementos traza e hidratos de carbono. Los ejemplos de sales incluyen sales de magnesio, por ejemplo $MgCl_2 \times 6H_2O$ y sales de hierro, por ejemplo $FeSO_4 \times 7 H_2O$, sales de potasio, por ejemplo KH_2PO_4 , KCl; sales de sodio, por ejemplo NaH_2PO_4 o Na_2HPO_4 y sales de calcio, por ejemplo $CaCl_2 \times 2H_2O$. Son ejemplos de aminoácidos los 20 aminoácidos proteinógenos conocidos, por ejemplo histidina, glutamina, treonina, serina, metionina. Los ejemplos de vitaminas incluyen: ascorbato, biotina, colina, mioinositol, y pantotenato-D, riboflavina. Los ejemplos de lípidos incluyen: ácidos grasos, por ejemplo ácido linoleico y ácido oleico; peptona de soja y etanol amina. Los ejemplos de detergentes incluyen Tween 80 y Pluronic F68. Un ejemplo de un tampón es HEPES. Los ejemplos de factores de crecimiento/hormonas/citocinas incluyen IGF, hidrocortisona e insulina (recombinante). Los ejemplos de elementos traza se conocen por los expertos en la materia e incluyen Zn, Mg y Se. Los ejemplos de hidratos de carbono incluyen glucosa, fructosa, galactosa y piruvato.

40

El pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto y osmolaridad del medio de cultivo celular en principio no son críticos y dependen del tipo de célula elegida. Preferentemente, el pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto y osmolaridad se seleccionan de tal manera que son óptimos para el crecimiento y productividad de las células. Los expertos en la materia conocen como encontrar el pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto y osmolaridad óptimos para el cultivo por perfusión. Usualmente, el pH óptimo está entre 6,6 y 7,6, la temperatura óptima entre 30 y 39 °C, la osmolaridad óptima entre 260 y 400 mOsm/kg. Como alternativa, pueden añadirse al medio durante la fermentación, desespumantes y antiespumantes a base de silicio o tensioactivos no iónicos tales como copolímeros de monómeros de bloque de monómeros de óxido de etileno/óxido de propileno. El medio puede ser agua

55

[0047] Los expertos en la materia conocen numerosas células de expresión adecuadas. En una realización preferida, la célula que expresa el biopolímero (por ejemplo, un polipéptido) de interés es al menos una célula seleccionada entre el grupo que consiste en: *E. coli*, *Bacillus*, levaduras del género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Kluyveromyces*, células CHO (Ovario de Hámster Chino), hibridomas, células BHK (riñón de cría de hámster) células de mieloma, células HEK-293, células linfoblastoides humanas, y una célula de ratón, por ejemplo una célula NSO.

60

Eliminación de impurezas durante la fermentación

5 **[0048]** El término "impurezas" debería entenderse como los expertos en la materia lo entenderían en el presente contexto. Las impurezas se entienden como compuestos químicos o biológicos producidos por las células presentes en el biorreactor, que limitan el crecimiento de las células. Las impurezas también pueden surgir de células que mueren o se rompen durante el procedimiento de fermentación. Las impurezas pueden comprender alcohol etílico, alcohol butílico, ácido láctico, acetona, etanol, compuestos gaseosos, péptidos, lípidos, amoníaco, compuestos aromáticos y fragmentos de ADN y ARN.

10 Aislamiento de biopolímero de interés

[0049] De acuerdo con la etapa (e) del primer aspecto, el biopolímero (por ejemplo, un polipéptido) de interés se aísla del medio de recogida. Esto puede hacerse de acuerdo con la técnica.

15 **[0050]** El reactor también puede comprender una así llamada purga, en la que se puede extraer el medio "entero" que comprende tanto polipéptido de interés con células. Esto puede usarse para la purificación corriente abajo adicional del producto de interés o simplemente desecharse.

Ya que la invención como se describe en la presente memoria da como resultado una alta densidad celular se puede usar ventajosamente el medio con alta densidad celular para empezar de nuevo (por ejemplo, siembra) una nueva fermentación.

20 **[0051]** El biopolímero aislado (por ejemplo, polipéptido) normalmente se formula en una composición comercial final relevante de interés (por ejemplo una composición farmacéutica de interés). Además normalmente se envasa en un contenedor adecuado.

25 Densidad celular

[0052] Las células que ventajosamente se someten al procedimiento de la invención, pueden ser cualquier tipo de célula que se beneficie de este procedimiento, es decir, que se cultiva a una alta densidad celular viable.

30 **[0053]** De acuerdo con el procedimiento de la invención, una alta densidad celular viable es preferentemente una densidad de al menos 15 millones de células/ml, preferentemente al menos 20 millones de células/ml, más preferentemente al menos 25 millones de células/ml, incluso más preferentemente al menos 30 millones de células/ml y lo más preferente al menos 50 millones de células/ml.

35 Regulación de los caudales de líquido

[0054] Esta sección se hace referencia a dos unidades de filtrado. Dicho en otras palabras, un filtro de producto ilustra el módulo de recogida de producto. Sin embargo, un dispositivo de sedimentación centrífuga o gravitacional podría haber ilustrado también el módulo de recogida de producto.

40 **[0055]** En un ejemplo adecuado las dos unidades de filtrado independientes pueden regularse de tal manera que pueden pasar a través de dos unidades de filtrado cantidades iguales de líquido. Esto proporciona la posibilidad de concentrar el polipéptido de interés en el biorreactor en comparación con una situación en la que el biorreactor funciona sin un filtro de impurezas (como se ilustra mediante los ejemplos de trabajo 1 y 3). Cuando aumenta la densidad celular y por lo tanto también los niveles de impurezas, la perfusión del líquido a través del filtro de producto puede iniciarse así como el medio recién preparado puede suministrarse con la misma velocidad para reponer los nutrientes consumidos y medio expulsado.

50 **[0056]** Cuando se alcanza el criterio de partida para la recogida, el efluente a través del filtro de impurezas también empieza de tal manera que velocidades iguales de medio perfunden fuera del filtro de impurezas y el producto y el sistema se reajustan de tal manera que el medio recién preparado se alimenta con la misma proporción que la suma del efluente a través del filtro de impurezas y el filtro de producto.

55 **[0057]** Esto proporciona una mejora significativa en el rendimiento de producto, ya que el efluente del medio se separa a través de dos unidades de filtrado (filtro de impurezas y filtro de producto) de tal manera que el producto queda concentrado, por ejemplo, con un factor de dos, comparado con si el producto y las impurezas se recogieran solo a través de una sola unidad de filtrado facilitando por lo tanto además el procesamiento corriente abajo y los costes implicados.

60 **[0058]** En otro ejemplo apropiado las dos unidades de filtrado independientes pueden regularse de tal manera que diferentes proporciones de líquido pueden pasar a través de cada unidad de filtrado reduciendo de este modo el flujo de recogida. Esto proporciona la posibilidad de recogida de los productos biológicos de alto peso molecular a una velocidad de flujo mientras se eliminan impurezas del recipiente de cultivo usando una velocidad de flujo diferente y por lo tanto la densidad celular y rendimiento de producto pueden aumentar drásticamente.

[0059] Esto se ilustra en los ejemplos de trabajo 1 y 2 en la presente memoria. En la etapa 3 del ejemplo de trabajo 1 los parámetros del efluente del líquido se ajustan de tal manera que 4 l/h perfunden fuera del filtro de impurezas y 4 l/h perfunden como producto recogido fuera del filtro de producto. En el ejemplo 2 se repite el ejemplo 1 con la única diferencia de que en la etapa 3; 6 l/h perfunden fuera del filtro de impurezas y 2 l/h perfunde como producto recogido fuera del filtro de producto. El resultado es que la acumulación de producto en la corriente de recogida se incrementa desde 850 mg/l hasta 1250 mg/l.

[0060] En consecuencia, las impurezas se eliminan mediante el filtro de impurezas por un caudal a través del filtro de impurezas de la etapa (b) del primer aspecto que es al menos 25 % del caudal a través del filtro de producto de la etapa (c) del primer aspecto. Más preferentemente, las impurezas se eliminan mediante el filtro de impurezas por un caudal a través del filtro de impurezas de la etapa (b) del primer aspecto que es al menos la misma que el caudal a través del filtro de producto de la etapa (c) del primer aspecto; incluso más preferentemente las impurezas se eliminan a través del filtro de impurezas mediante un caudal a través del filtro de impurezas de la etapa (b) del primer aspecto que es al menos dos veces el caudal a través del filtro de producto de la etapa (c) del primer aspecto.

[0061] Durante el inicio de la fermentación cuando el nivel de producto e impurezas son bajos, el filtro de impurezas y el filtro de producto pueden cerrarse de tal manera que no pase líquido a través de las unidades de filtrado. Cuando la densidad celular aumenta, por lo tanto también los niveles de impurezas, puede iniciarse la perfusión del líquido fuera a través del filtro de impurezas, así como puede suministrarse el medio recién preparado con la misma velocidad para reponer los nutrientes consumidos y el medio expulsado. La velocidad de purga de permeado y la velocidad de alimentación pueden ajustarse en consecuencia al nivel de impurezas acumuladas. Cuando se alcanza el criterio de partida para la recogida, el efluente a través del filtro de producto se inicia y el sistema se reajusta de tal manera que el medio recién preparado se alimenta con una velocidad que corresponde a la suma del efluente a través del filtro de impurezas y el filtro de producto. De esta manera, el efluente de impurezas a través del filtro de impurezas puede ajustarse de acuerdo con la velocidad con la que se acumulan tales impurezas. De la misma manera, el efluente del producto a través del filtro de producto puede ajustarse de acuerdo con la velocidad en la que el producto se acumula y en consecuencia, el medio recién preparado se alimenta con una velocidad que corresponde a la suma de efluente a través del filtro de impurezas y el filtro de producto.

[0062] Por lo tanto, hasta que el sistema se estabiliza y se alcanza un estado estable el producto se acumula en el biorreactor a menor concentración que cuando se alcanza la máxima densidad celular. En consecuencia, debería ser beneficioso emplear el sistema con menor velocidad de efluente a través del filtro de producto que a través del filtro de impurezas de tal manera que el producto se obtiene en una solución más concentrada. En muchos casos esto facilitará además el procesamiento corriente abajo y los costes implicados. Otra ventaja es por ejemplo, que los polipéptidos inestables que pueden inactivarse o degradarse durante un tiempo prolongado consumidos en el biorreactor pueden recogerse ya a una densidad celular baja a través del filtro de producto a bajas velocidades de efluente mientras se emplea el filtro de impurezas a una velocidad de efluente alta. De forma similar, los productos, que sólo se expresan a bajos niveles, pueden también concentrarse por encima mediante el filtro de producto de tal manera que el coste de la purificación corriente abajo puede optimizarse significativamente.

[0063] Cuando el biorreactor es de al menos 50 l se prefiere que en la etapa (d) del primer aspecto se añadan al menos 12 l de medio recién preparado al día que se elimina/recoge mediante el filtro de impurezas y el filtro de producto de acuerdo con las etapas (b) y (c) del primer aspecto. En varias situaciones, se puede añadir ventajosamente más medio recién preparado tal como, por ejemplo, al menos 1 vez el volumen diario del biorreactor.

EJEMPLOS:

50 **Ejemplo 1:**

[0064]

1. Un biorreactor de volumen de trabajo de 100 l, con 50 l de medio Ex-cell se inocula con 15 l de CHO-K1 que expresan un anticuerpo IgG. El sistema está equipado con un módulo ATF 6 con una membrana de 0.45 micrómetros (filtro de producto) para la recogida del producto y un módulo ATF 6 con una membrana de 10.000 NMWC (filtro de impurezas) para la perfusión de bajo peso molecular. Después de una semana de expansión y 5 días de fermentación del producto la densidad celular alcanzó aproximadamente 15 millones de células/ml en un volumen de trabajo de 100 l, el criterio de partida para el uso de recogida para el procesamiento corriente abajo.

2. El biorreactor se alimenta con 150 l de medio al día, hasta los 100 l de volumen de trabajo y se obtiene un estado estable después de 10 días de recogida con una concentración celular viable de aproximadamente 30 millones de células/ml y una productividad de aproximadamente 45 gramos de anticuerpo al día. La concentración de anticuerpo en la corriente de recogida fue de aproximadamente 300 mg/l. Todo el medio

añadido perfundió fuera a través del filtro de producto.

3. El día 10 de recogida se inicia el ATF de NMWC 10.000 y los parámetros se reajustan de tal manera que el día 12 se añaden 8 l/h (192 l al día) de medio perfundiendo 4 l/h fuera del ATF de 10.000 NMWC y perfundiendo 4 l/h como producto recogido fuera del ATF de 0,45 micrómetros. El día 20, el sistema se estabiliza a una densidad celular viable de aproximadamente 60 millones de células/ml y alcanza una productividad de aproximadamente 85 gramos por día. La concentración de anticuerpo en la recogida se incrementa al mismo tiempo hasta aproximadamente 850 mg/l.
- 5
- 10 **[0065]** El producto recogido se carga en una columna MabSelect sin ningún ajuste de volumen o conductividad con un rendimiento del 90 % en el eluato MabSelect para purificar el anticuerpo IgG.

Conclusión de los resultados

- 15 **[0066]** En la etapa 2 solo se usa un filtro, que es el filtro de producto y se consigue una densidad celular de aproximadamente 30 millones de células/ml y una acumulación de producto de aproximadamente 300 mg/l en el medio y por lo tanto en la corriente de recogida.
- [0067]** En la etapa 3 se usan dos filtros de acuerdo con la invención como se describe en la presente memoria, un filtro de impurezas y un filtro de producto. Esto proporciona una mejora significativa ya que se proporciona una densidad celular de aproximadamente 60 millones de células/ml y en particular una acumulación de producto de aproximadamente 850 mg/l en la corriente de recogida, ya que el efluente de medio se ha separado a través de dos unidades de filtrado (filtro de impurezas y filtro de producto) de tal manera que el producto queda concentrado desde aproximadamente 300 mg/l detectados en el biorreactor antes de que se inicie el filtro de recogida de producto hasta aproximadamente 850 mg/l después de que el filtro de producto se ajuste para funcionar.
- 20
- 25

Ejemplo 2:

- [0068]** Se repite el ejemplo 1 anterior con la única diferencia de que en la etapa 3; perfunden 6 l/h del ATF de NMWC 10.000 y perfunden 2 l/h como producto recogido fuera del ATF de 0,45 micrómetros.
- 30
- [0069]** El resultado fue que la acumulación de producto en la corriente de recogida aumenta desde aproximadamente 850 mg/l hasta aproximadamente 1250 mg/l mediante el funcionamiento del efluente de líquido a través del filtro de impurezas tres veces la velocidad del efluente de líquido a través del filtro de producto.
- 35

Ejemplo 3:

- [0070]** Se repite el Ejemplo 1 anterior con la única diferencia de que en la etapa 3 no funciona el ATF de NMWC 10.000 (filtro de impurezas), y todo el medio añadido 8 l/h se recoge fuera del ATF de 0,45 micrómetros (filtro de producto).
- 40
- [0071]** El día 20 el sistema se estabiliza a una densidad celular viable de aproximadamente 45 millones de células/ml y alcanza una productividad de aproximadamente 60 gramos por día. La concentración de anticuerpo en la recogida desciende al mismo tiempo hasta aproximadamente 425 mg/l.
- 45
- [0072]** Esto demuestra que usando el filtro de impurezas en la etapa 3 se mejoran tanto la densidad celular como el rendimiento de producto.

Ejemplo 4:

- 50 **[0073]** Este ejemplo se realizó esencialmente como se ha descrito para el ejemplo 1 anterior.
- [0074]** Se hizo lo siguiente.
- 55
1. Un biorreactor de volumen de trabajo de 3,0 l, relleno con medio CD- CIM1 se inocula con una línea celular DG44 CHO que expresa un anticuerpo IgG a una densidad de siembra inicial viable de 0,5 millones de células/ml.
- El sistema se equipa con un módulo ATF 2 con una membrana de 0,2 micrómetros (filtro de producto) y un módulo ATF 2 con una membrana de NMWC 10.000 (filtro de impurezas) para la perfusión de pesos moleculares bajos. En el día 2 la densidad celular viable fue de 3,0 millones de células/ml y los dos filtros iniciaron la recogida del perfusado.
- 60
2. El medio de alimentación en el biorreactor aumentó hasta 4,5 l de medio al día basándose en mantener una velocidad de perfusado específica de 0,3 nl/células*día y se obtiene un estado estable. Se eliminan 2,25 l de perfusado a través del filtro de recogida y se eliminan 2,25 l de perfusado a través del
- 65

filtro de impurezas. Después de 9 días de recogida la concentración celular viable es de 80 millones células/ml y una productividad de 935 mg de anticuerpo por litro de volumen de trabajo del biorreactor. La concentración de anticuerpo en la corriente de recogida es de 765 mg/l.

5 Conclusión de los resultados

[0075] Las conclusiones técnicas de este ejemplo estuvieron esencialmente de acuerdo con las conclusiones del ejemplo 1 anterior.

10 **[0076]** En la etapa 2 del ejemplo 4 se usan 2 filtros de acuerdo con la invención como se describe en la presente memoria, un filtro de impurezas y un filtro de producto. Esto proporciona una mejora significativa ya que el biorreactor es capaz de conseguir una densidad celular de aproximadamente 80 millones de células/ml y una acumulación de producto de 765 mg/l en la corriente.

15 **[0077]** Ya que el flujo del medio se ha separado a través de dos unidades de filtrado (filtro de impurezas y filtro de producto) el producto se concentra entre 260 mg/l detectados en la corriente de recogida sin la instalación de dos filtros (véase ejemplo 5) hasta 765 mg/l cuando se usaron dos filtros. Además la densidad celular aumentó desde 50 millones de células/ml cuando se usó sólo el filtro de producto (ejemplo 5) hasta 80 millones de células/ml cuando se usaron tanto el filtro de impurezas como el filtro de producto.

20

Ejemplo 5:

[0078] Se repite el Ejemplo 4 anterior con la única diferencia de que en la etapa 3 el filtro de impurezas no funcionaba, y todo el medio añadido se recogió fuera del filtro de producto

25

Conclusiones de los resultados

[0079] Las conclusiones técnicas de este ejemplo estuvieron esencialmente de acuerdo con las conclusiones del ejemplo 3 anterior.

30

[0080] Al día 9 de la recogida se consiguió una densidad celular viable de 50 millones de células/ml y se alcanzó una productividad de aproximadamente 525 mg de anticuerpo por litro de volumen de trabajo del biorreactor. Comparado con el ejemplo 4, la concentración de anticuerpo en la recogida fue al mismo tiempo solo de 260 mg/l.

35 **[0081]** Esto demuestra que usar el filtro de impurezas del ejemplo 4 mejoró tanto la densidad celular y la productividad como la concentración de producto en la recogida.

REFERENCIAS

40

- 1: Documento US 6544424
- 2: Documento EP 270905A
- 3: Stark *et al.*, Advances in biochemical Engineering/ Biotechnology 2003 vol. 80, 149-175.
- 4: Linardos *et al.*, Biotechnology and Bioengineering 1992, vol. 39, 504-510.
- 5: Poertner *et al.*, Applied Microbiology and Biotechnology, 1998 vol. 50, 403-414.

45

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de un biopolímero de interés en un proceso de fermentación en continuo por perfusión, en el que el biorreactor comprende una unidad de filtrado de impurezas y un módulo de recogida de producto, caracterizado porque:

- (i) la unidad de filtrado de impurezas permite eliminar impurezas con un PM inferior al PM del biopolímero de interés mientras se retienen células y el biopolímero de interés en el biorreactor (llamado "filtro de impurezas"); y
- (ii) el módulo de recogida de producto permite eliminar el biopolímero de interés e impurezas mientras se retienen células en el biorreactor (llamado "módulo de recogida de impurezas");

en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- (a) fermentar células que expresan el biopolímero de interés en el biorreactor en un medio adecuado en condiciones adecuadas;
- (b) durante la fermentación se eliminan impurezas mediante el filtro de impurezas;
- (c) durante la fermentación se recoge el biopolímero de interés mediante el módulo de recogida de producto;
- (d) durante la fermentación se añade medio recién preparado para reponer nutrientes consumidos por las células y equilibrar el medio eliminado durante las etapas (b) y (c); y
- (e) aislar el biopolímero de interés del medio de recogida; y

en el que la densidad celular en el biorreactor durante la fermentación alcanza al menos 10 millones de células por ml de medio; y

en el que se eliminan impurezas a través mediante impurezas por un caudal a través del filtro de impurezas de la etapa (b) que es al menos un 25 % del caudal a través del módulo de recogida de producto de la etapa (c).

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se eliminan impurezas mediante el filtro de impurezas por un caudal a través del filtro de impurezas de la etapa (b) de la reivindicación 1 que es al menos el doble del caudal a través del módulo de recogida de producto de la etapa (c) de la reivindicación 1.

3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el biopolímero de interés es un polipéptido de interés y en el que el módulo de recogida de producto es una unidad de filtrado (llamada "filtro de producto").

4. El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el biopolímero de interés es un polipéptido de interés y en el que el módulo de recogida de producto se basa en sedimentación centrífuga o gravitacional.

5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que:

- el polipéptido de interés tiene un PM de al menos 20.000 kDa;
- el biorreactor tiene un volumen de al menos 50 L;
- las dos unidades de filtrado diferentes (filtro de impurezas y producto) son filtros de membrana y se sitúan en dos aparatos de soporte de filtro separados físicamente;
- el filtro de impurezas tiene tamaño de poro con un punto de corte nominal de peso molecular de membrana (NMWC) en el intervalo de 2000 a 15.000 NMWC; y
- el filtro de producto en el intervalo de 50.000 NMWC a 2 µm.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,

en el que el filtro de impurezas tiene un tamaño de poro de punto de corte de peso molecular (NMWC) de un máximo de 80 % del PM del biopolímero (por ejemplo un polipéptido) de interés, es decir, si el PM del polipéptido de interés es 100.000 el punto de corte máximo del filtro de impurezas es 80.000 NMWC; y

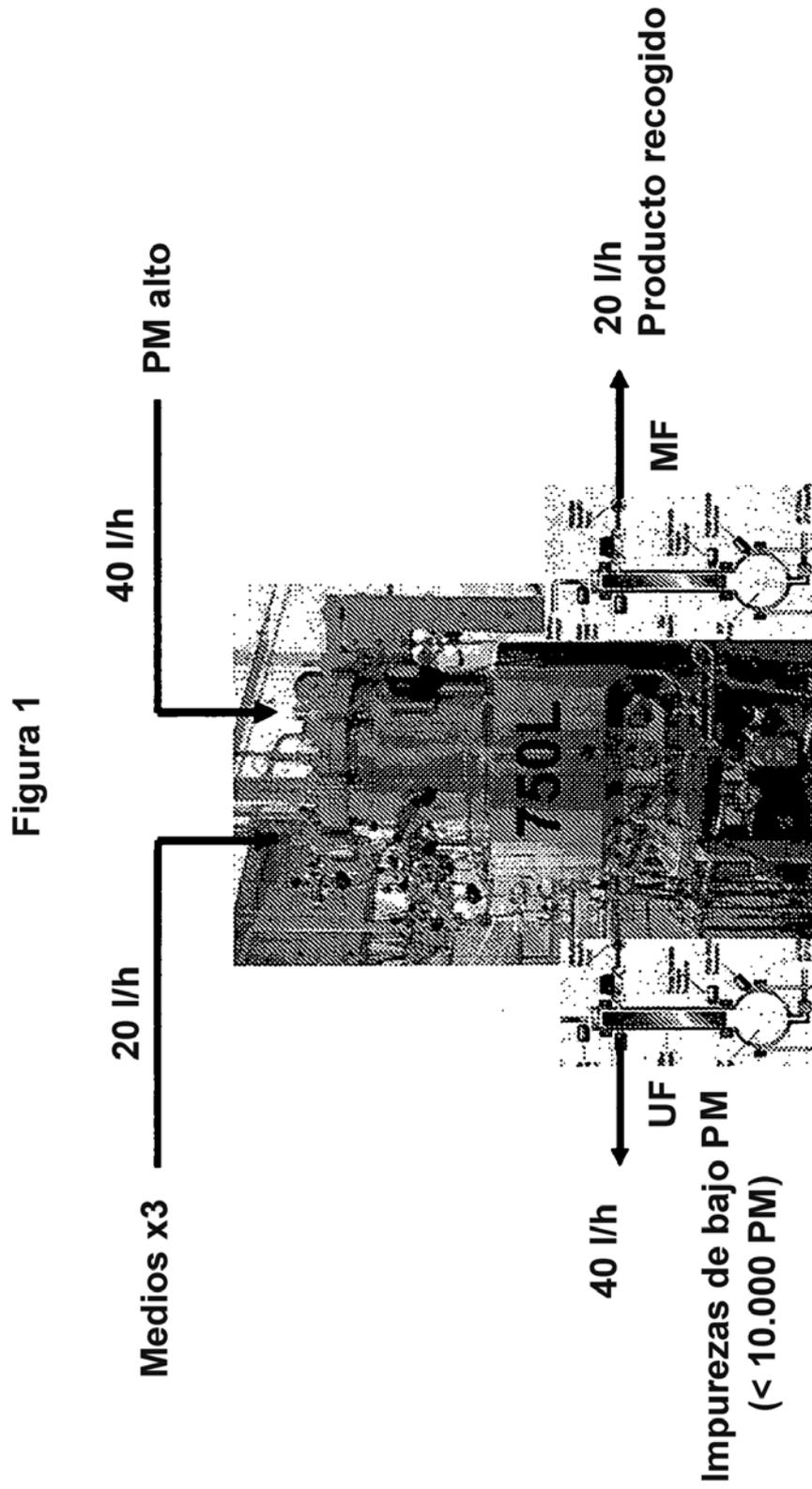
en el que el filtro de producto de la reivindicación 2 tiene un tamaño de poro de punto de corte de peso molecular (NMWC) de al menos 1,5 veces el PM del biopolímero (por ejemplo un polipéptido) de interés, es decir, si el PM del polipéptido de interés es 100.000 el punto de corte preferido del filtro de producto es al menos 150.000 NMWC.

7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el polipéptido de interés es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, hormona del crecimiento humana, hormona de estimulación de folículo, Factor VIII, eritropoyetina (EPO), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), alfa-galactosidasa A, alfa-L-iduronidasa (rhIDU; Iaronidasa), N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (rhASB; galsulfasa), ADNasa, Activador de plasminógeno tisular (APT), Glucocerebrosidasa, Interferón (IF), Insulina, derivados de insulina, factor de crecimiento similar a insulina 1, Tenecteplasa, factor antihemofílico, factor de coagulación humana, Etanercept, Trastuzumab, Infliximab, Basiliximab, Daclizumab o Glucocerebrosidasa.

8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la célula que expresa el polipéptido de interés es al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en *E. coli*, *Bacillus*, levadura del género

Saccharomyces, Pichia, Aspergillus, Fusarium, Kluyveromyces, célula CHO (Ovario de Hámster Chino), hibridomas, célula BHK (Riñón de Cría de Hámster), célula de mieloma, célula HEK-293, célula linfoblastoide humana y una célula de ratón.

- 5 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el biorreactor es de al menos 50 L y en la etapa (d) de la reivindicación 1 se añaden al menos 12 L de medio recién preparado al día que se eliminan/recogen mediante el filtro de impurezas y el módulo de recogida de producto de acuerdo con las etapas (b) y (c) de la reivindicación 1.
- 10 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido de interés aislado de la etapa (e) de la reivindicación 1 se formula en una composición final comercial relevante de interés, tal como una composición farmacéutica de interés.



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 6544424 B [0008] [0009] [0082] • US 5342781 A [0031]
5 • EP 270905 A [0010] [0082]

15 Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- 20 • STARK et al. *Advances in biochemical Engineering/Biotechnology*, 2003, vol. 80, 149-175 [0010] [0082]
• LINARDOS et al. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, vol. 39, 504-510 [0010] [0082]
• POERTNER et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, vol. 50, 403-414 [0010] [0082]