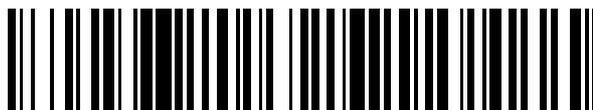


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 006**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755	(2006.01)	B07B 11/06	(2006.01)
C07K 1/34	(2006.01)	C12M 1/00	(2006.01)
C07K 1/14	(2006.01)		
A61K 38/00	(2006.01)		
B01D 61/00	(2006.01)		
B01D 61/02	(2006.01)		
B01D 61/08	(2006.01)		
B01D 61/14	(2006.01)		
B07B 7/00	(2006.01)		
B07B 7/02	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2005 E 05800224 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 1807101**

54 Título: **Dispositivos y métodos de preparación continua integrada de moléculas biológicas**

30 Prioridad:

30.09.2004 US 614995 P

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

13.05.2016

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
100 Bayer Boulevard, P.O. Box 915
Whippany, NJ 07961, US**

72 Inventor/es:

**VOGEL, JENS;
GIOVANNINI, ROBERTO;
KONSTANTINOV, KONSTANTIN B.;
NGUYEN, HUONG y
WU, PENG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 570 006 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivos y métodos de preparación continua integrada de moléculas biológicas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método y sistema mejorado de purificación de una molécula de interés a partir de una mezcla heterogénea de moléculas. Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos de purificación de una proteína de interés en una corriente de alimentación de fluido de cultivo de tejido a partir de un proceso de fermentación por perfusión continua.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las materias que no están englobadas por el alcance de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

15 Antecedentes de la invención

Es muy conocido para aquellos familiarizados con el campo que en los últimos años se han establecido varios procesos de cultivo celular continuo, también llamados procesos de perfusión continua, con gran éxito comercial. Sin embargo, el proceso de aislamiento tras la fermentación por perfusión continua es generalmente un proceso discontinuo, y está físicamente y logísticamente separado del proceso aguas arriba continuo. En estos procesos, el fin principal de la etapa de aislamiento es capturar el producto de altos volúmenes de sobrenadante de cultivo relativamente diluido. La concentración del producto tiene que enfatizarse con respecto a la logística de proceso y los requisitos de espacio, mientras que la eliminación simultánea de contaminantes (purificación) es importante para minimizar el número requerido de etapas de purificación aguas abajo adicionales.

La Figura 1 muestra un esquema de un proceso de aislamiento del estado de la técnica típico de fermentación por perfusión continua, como es muy conocido para aquellos familiarizados con el campo. El sistema de fermentación por perfusión continua comprende un dispositivo de retención de células (1), que mantiene a la mayoría de las células que producen el producto en el sistema de fermentación. Una corriente de cosecha continua del sistema de perfusión continua, que todavía contiene algunas células, residuos y otras partículas, se bombea usando una bomba de cosecha (2) en recipientes de recogida (3) grandes, tales como tanques de acero inoxidable. Estos recipientes de almacenamiento de la cosecha normalmente tienen que ser enfriados con el fin de mantener las pérdidas de producto debido a la degradación dentro de un intervalo factible.

Una vez se ha recogido un volumen especificado, que normalmente es después de 1-4 días o más, los recipientes de recogida de la cosecha se desconectan del recipiente de fermentación estéril y el material recogido se designa un lote de cosecha. La siguiente etapa es eliminar células, residuos y partículas (etapa 2). A escala industrial, esto normalmente se hace usando centrifugación (4) seguido de filtración en membrana de extremo muerto (5), o por filtración profunda de extremo muerto (6), seguido de filtración en membrana de extremo muerto (7). Otra técnica algunas veces usada es la microfiltración de flujo tangencial (o "flujo cruzado"). En cualquier caso, el producto del proceso de eliminación de partículas es un lote de fluido de cultivo de tejido clasificado, o cTCF (8). Más detalles sobre la separación de partículas para productos biotecnológicos puede encontrarse en libros de texto estándar, tales como *Biotechnology*, Vol. 3, *Bioprocessing*, Wiley-VCH, 2 edición (1996), ISBN: 3527283137.

En la siguiente etapa (etapa 3), el lote de fluido de cultivo de tejido clasificado se procesa adicionalmente para concentrar y, si es posible, purificar el producto. Esto se hace normalmente por ultrafiltración de flujo cruzado o por cromatografía en lecho relleno.

En el caso de la ultrafiltración de flujo cruzado, el cTCF se bombea en el tanque de recirculación (9) del sistema. Se usa una bomba (10) para impulsar el material a través de un ultrafiltro de flujo cruzado. El producto es retenido por la membrana y se recircula como retenido en el tanque de recirculación, mientras que el agua y los contaminantes más pequeños son impulsados a través de la membrana en el permeado (11) debido a la presión transmembrana generada por la caída de presión en el módulo de ultrafiltración. En cada pase a través del filtro, el cTCF, por tanto, se concentra más, y el volumen de cTCF total se reduce hasta que se alcanza un factor de concentración deseado.

Una vez se alcanza el factor de concentración deseado, el proceso se detiene, y el volumen de concentrado restante (aislado) se drena del sistema y se recoge. Más detalles sobre la ultrafiltración de flujo cruzado para la concentración de productos biotecnológicos puede encontrarse en libros de texto estándar, tales como *Biotechnology*, Vol. 3, *Bioprocessing*, Wiley-VCH, 2 edición (1996), ISBN: 3527283137.

En el caso de la cromatografía en lecho relleno, el cTCF se bombea sobre una columna de cromatografía (12) que contiene un lecho de resina relleno. El producto se une a la resina y entonces se eluye en forma normalmente concentrada y purificada (aislado, 13) usando un tampón de elución (14) adecuado, después de lo cual la columna se limpia y se regenera usando tampones y disoluciones de limpieza (14) adecuadas.

Otras variantes de la cromatografía que se han propuesto para la concentración/purificación de cTCF son cromatografía en lecho expandido y cromatografía en membrana. La cromatografía en lecho expandido puede

procesar disoluciones que contienen partículas. Sin embargo, todavía se requiere filtración del aislado después de la cromatografía, aunque se reduzcan las áreas de filtración. La cromatografía en membrana utiliza pisos de membranas de microfiltración modificadas en lugar de lechos de resina rellenos. La ventaja es que la transferencia de masa es en gran parte convectiva en vez de entonces difusiva, que permite separación más rápida. De otro modo, el proceso normalmente es equivalente a la cromatografía en lecho relleno estándar. Más detalles sobre la cromatografía para la concentración y purificación de productos biotecnológicos pueden encontrarse en libros de texto estándar, tales como Protein Purification, Principles, High-Resolution Methods, and Applications, Wiley-VCH, 2ª Edición (1998), ISBN 0-471-18626-0.

Frecuentemente, el aislado a granel se congela entonces y se guarda para uso posterior en etapas de purificación aguas abajo adicionales.

Así, como se ha descrito anteriormente, el proceso de aislamiento es generalmente un proceso discontinuo, y está físicamente y logísticamente separado del proceso aguas arriba continuo. Por tanto, aunque la fermentación tiene que realizarse estéril, el aislamiento (es decir, eliminación de partículas y concentración/purificación) se realiza esencialmente limpio, pero no estéril.

Los procesos del estado de la técnica que se han descrito anteriormente tienen varios problemas:

P1. Pérdidas de rendimiento y posible reducción de la calidad debido al alto tiempo de residencia del producto. La cosecha de la fermentación por perfusión continua necesita recogerse y guardarse durante periodos de tiempo significativos, como se explica resumidamente anteriormente, antes de que pueda procesarse un lote de aislamiento. La cosecha recogida, aunque enfriada, todavía proporciona un medio perjudicial para los productos de proteína complejos e inherentemente inestables. Por tanto, se producen significativas pérdidas de producto, que reduce la capacidad de la planta y aumenta el coste de los bienes. Además, la calidad del producto puede afectarse adversamente.

P2. Se requieren grandes instalaciones de salas frías o recipientes enfriados para el almacenamiento intermedio de grandes volúmenes de cosecha, conduciendo a altos costes de capital y contradiciendo la citada ventaja de compactidad y movilidad de los fermentadores de perfusión.

P3. Las tecnologías de concentración/purificación convencionales (por ejemplo, ultrafiltración, cromatografía en lecho relleno) tienen caudal volumétrico relativamente bajo, tiempos de procesamiento significativos y requieren mucha mano de obra. Como resultado, normalmente no se realiza más de 1 proceso discontinuo por día.

P4. Además, los actuales procesos y métodos de aislamiento tienen dificultades logísticas que tratan con los volúmenes de proceso variables en plantas de fermentación que implican más de un fermentador. En las plantas de perfusión continua a gran escala están en funcionamiento un número variable de fermentadores.

P5. Además, los procesos de aislamiento del estado de la materia funcionan limpios, pero pueden no operar estériles. Esto conduce frecuentemente a un número significativo de lotes rechazados debido a cuestiones de carga microbiana.

P6. La utilización de desechables, tales como filtros desechables, montajes, bolsas, etc., aunque muy deseables en la producción de parenterales humanos (por ejemplo, para evitar la limpieza y la validación de limpieza y otras cuestiones) es muy costosa, y de hecho frecuentemente no económica.

Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención proporcionar un proceso de separación de proteínas continuo integrado que sea capaz de operar durante periodos de tiempo sostenidos bajo condiciones estériles.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un aparato y proceso de purificación de moléculas a partir de una mezcla de fluido heterogénea. Más particularmente, la invención se refiere a un proceso de purificación de una molécula de interés a partir de una mezcla de fluido clarificada heterogénea de la que se han eliminado contaminantes en partículas. El proceso comprende la etapa de filtrar una mezcla de fluido clarificada heterogénea por ultrafiltración continua a una velocidad de flujo específica por debajo del punto de transición de la molécula de interés en la región dependiente de la presión de la curva de flujo frente a TMP, en el que la velocidad de flujo específica se mantiene sustancialmente constante durante toda la ultrafiltración continua.

En realizaciones particulares, el proceso de la invención comprende filtrar la mezcla de fluido clarificada a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados aproximadamente igual a entre 0,1 y 2 veces la velocidad de flujo volumétrica de la mezcla de fluido clarificada en litros/hora. En otra realización, el proceso de la invención comprende filtrar la mezcla de fluido clarificada a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados aproximadamente igual a entre 0,3 y 1 veces la velocidad de flujo volumétrica de la mezcla de fluido clarificada en litros/hora.

El proceso de la invención permite ventajosamente filtrar la mezcla clarificada a una velocidad de flujo específica que produce una concentración de pared inferior a aproximadamente el 20 %, inferior al 15 % o inferior al 10 % superior a la concentración de retenido, sin polarización por concentración apreciable.

- En una realización más específica, la invención se refiere a un proceso integrado, continuo y estéril para fermentación por perfusión continua, eliminación de partículas y purificación/concentración. En un aspecto de la invención, el proceso comprende filtrar la mezcla de cultivo de tejido por un proceso de separación que separa selectivamente la proteína de interés de la mezcla en un punto establecido operacional por debajo del punto de transición de la proteína en la región dependiente de la presión de la curva de flujo frente a TMP para producir un aislado de producto estéril, libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado, en el que la velocidad de flujo específica a través del proceso de separación se mantiene sustancialmente constante a un nivel inferior al punto de transición de la proteína.
- En otro aspecto de la invención, el proceso es un proceso de purificación continuo de una proteína de interés a partir de una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea, que comprende:
- (a) producir por un proceso de fermentación por perfusión continua una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea que contiene una proteína de interés;
 - (b) transferir la mezcla de fluido de cultivo de tejido a un proceso de eliminación de partículas continuo integrado con el proceso de fermentación por perfusión continua;
 - (c) eliminar contaminantes en partículas del fluido de cultivo de tejido en el proceso de eliminación de partículas continuo para producir un fluido de cultivo de tejido clarificado que contiene la proteína de interés;
 - (d) transferir el fluido de cultivo de tejido clarificado a un proceso de purificación continuo integrado con el proceso de eliminación de partículas continuo, en el que el proceso de purificación continuo es ultrafiltración y el fluido de cultivo de tejido clarificado se filtra a una velocidad de flujo específica que produce una concentración de pared inferior al 20 % superior a una concentración de retenido; y
 - (e) purificar la proteína de interés del fluido de cultivo de tejido clarificado en el proceso de purificación continuo;
- en el que la velocidad de flujo específica de la mezcla a través del proceso de fermentación por perfusión continua, el proceso de eliminación de partículas continuo y el proceso de purificación continuo se mantiene sustancialmente constante.
- En otro aspecto más, el proceso es un proceso de purificación semi-continuo de una proteína de interés a partir de una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea, que comprende:
- (a) producir por un proceso de fermentación por perfusión continua una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea que contiene una proteína de interés;
 - (b) transferir la mezcla de fluido de cultivo de tejido a un proceso de eliminación de partículas continuo integrado con el sistema de fermentación por perfusión continua;
 - (c) eliminar contaminantes en partículas del fluido de cultivo de tejido en el proceso de eliminación de partículas continuo para producir un fluido de cultivo de tejido clarificado que contiene la proteína de interés;
 - (d) transferir el fluido de cultivo de tejido clarificado a un recipiente amortiguador integrado con el proceso de eliminación de partículas continuo;
 - (e) transferir intermitentemente el fluido de cultivo de tejido clarificado a un proceso de purificación integrado con el recipiente amortiguador; y
 - (f) purificar la proteína de interés del fluido de cultivo de tejido clarificado en el sistema de purificación para producir un aislado de producto estéril, libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado que contiene la proteína de interés;
- en el que la velocidad de flujo específica de la mezcla a través del proceso de fermentación por perfusión continua y el proceso de eliminación de partículas continuo se mantiene sustancialmente constante.
- La presente invención también se refiere a un aparato de separación de una proteína de interés de una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea. En un aspecto de la invención, el aparato comprende: (a) un sistema de fermentación por perfusión continua; (b) un sistema de eliminación de partículas continuo integrado con el sistema de fermentación por perfusión; y (c) un sistema de purificación continuo que es ultrafiltración integrada con el sistema de eliminación de partículas, en el que el aparato está adaptado para mantener condiciones estériles.
- En otro aspecto de la invención, el aparato comprende: (a) un sistema de fermentación por perfusión continua; (b) un sistema de eliminación de partículas continuo integrado con el sistema de fermentación por perfusión; y (c) un sistema de purificación intermitente que es ultrafiltración integrada con el sistema de eliminación de partículas, en el que el aparato está adaptado para mantener condiciones estériles.
- El sistema de purificación puede ser, por ejemplo, un sistema de ultrafiltración o un sistema de adsorción/desorción convectiva, o cualquier otro sistema capaz de purificar o purificar parcialmente una proteína de interés de una mezcla heterogénea en un sistema integrado, continuo o semi-continuo, estéril como se describe en el presente documento.
- El proceso y aparato de la invención están adaptados para permitir el procesamiento continuo de una mezcla de fluido heterogénea, tal como un fluido de cultivo celular, a una velocidad de flujo sustancialmente constante. En un

aspecto particular de la invención, el proceso y aparato de la invención están adaptados para permitir el procesamiento continuo de una mezcla de fluido de cultivo de células o de tejido heterogénea a una velocidad de flujo sustancialmente constante por debajo del punto de transición de la proteína en la región dependiente de la presión de la curva de flujo frente a TMP durante un periodo continuo y durante todo el proceso de purificación.

5 Estos y otros aspectos de la invención se describen en detalle más adelante en la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

10 Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de la memoria descriptiva, ilustran realizaciones de la invención, y, junto con la descripción detallada de la realización, sirven para explicar los principios de la invención y sus beneficios.

15 FIG. 1: Esquema del proceso de perfusión continua convencional seguido de 3 etapas de proceso de aislamiento físicamente y lógicamente separadas (recogida de la cosecha por lotes, eliminación de partículas del lote y concentración/purificación del lote)

20 FIG. 2: Representación esquemática de 2 realizaciones del dispositivo inventivo A para la fabricación continua, integrada y estéril. Esquema de realización A1 mostrado a la izquierda y esquema de realización A2 mostrado a la derecha.

25 FIG. 3: Representación esquemática de 2 realizaciones del dispositivo inventivo B para la fabricación continua, integrada y estéril. Esquema de realización B1 mostrado a la izquierda y esquema de realización B2 mostrado a la derecha.

FIG. 4: Esquema de una realización del sistema de eliminación de partículas continuo integrado inventivo (100), un elemento de tanto el dispositivo inventivo A como el dispositivo inventivo B.

30 FIG. 5: Representaciones esquemáticas de realizaciones adicionales del dispositivo inventivo A que combinan múltiples elementos para tanto aumentar la capacidad de la planta global (A3) como el rendimiento de concentración y separación (A4).

35 FIG. 6: Representaciones esquemáticas de realizaciones adicionales del dispositivo inventivo B.

FIG. 7: Realización adicional de dispositivos inventivos que combina los elementos del dispositivo A y dispositivo B en serie para aumentar en rendimiento de concentración y separación global.

40 FIG. 8: Comparación de ejemplo de las capacidades de carga total por 10" de cápsula de filtro para el proceso discontinuo convencional y realización del dispositivo inventivo y método para la eliminación de partículas continua (proceso de filtración continuo integrado) usando cápsulas de filtro comerciales idénticas. Se muestra método de ejemplo de producción de factor de coagulación de la sangre VIII recombinante.

45 FIG 9: Ejemplo de curva de presión-flujo (flujo de permeado específico en LMH = litros/hora/m² por encima de la presión transmembrana) y determinación del punto de operación. El círculo muestra el punto de operación típico que se ajustará mediante la TMP para procesos discontinuos convencionales. El rectángulo muestra la región operacional preferida que se ajustará mediante la bomba de permeado según el método de uso del dispositivo inventivo A.

50 FIG. 10: Ejemplo de la distribución del tiempo de residencia y tiempo de residencia medio del sistema de UF continuo integrado (300) según el método de uso del dispositivo inventivo A. Medido para el sistema continuo desechable con módulo de 290 cm² (62,5 cm de longitud), 120 LMH de flujo cruzado, 0,2 LMH de flujo de retenido, 2 LMH de flujo de permeado.

55 FIG. 11: Ejemplo de aislamiento de rFVIII de fermentación por perfusión continua libre de proteínas del plasma usando una realización del dispositivo inventivo A. Comparación del rendimiento de aislamiento promedio del método continuo inventivo en comparación con el rendimiento promedio de aislamiento discontinuo, que incluye una propagación de la desviación estándar. Se usaron 3 lotes consecutivos para determinar el rendimiento discontinuo, mientras que se usaron 3 puntos consecutivos (días) para el proceso continuo.

60 FIG. 12: Ejemplos de rendimiento del dispositivo inventivo A. Presión transmembrana y flujo específico del sistema de ultrafiltración continua integrada (300) en función del tiempo del proceso continuo para 3 ejemplos diferentes mostrados. Triángulos = membrana de 100 kD, factor de coagulación de la sangre VIII recombinante (rFVIII); Cuadrados = membrana de 10 kD, interleucina-2 recombinante; Círculos = membrana de 50 kD, glucoproteína genéticamente manipulada (Mr > 100 kD). Todos los ejemplos mostrados son de fermentación por perfusión continua libre de proteínas del plasma.

65

FIG. 13: Ejemplo de rendimiento a largo plazo del dispositivo inventivo A directamente acoplado a la fermentación por perfusión continua de línea celular que co-expresa 2 productos de proteína (proteína verde fluorescente GFP e IL-2SA). Se muestra la presión transmembrana y el flujo específico del sistema de ultrafiltración continua (300) inventivo en función del tiempo de proceso continuo. Se usó membrana de 10 kD.

FIG. 14: Ejemplo de rendimiento a largo plazo del dispositivo inventivo A directamente acoplado a la fermentación por perfusión continua de línea celular que co-expresa 2 productos de proteína (proteína verde fluorescente GFP e IL-2SA). Se usó membrana de 10 kD. Factor de concentración de ambos productos de proteína, como se ha determinado por ensayos específicos, y factor de concentración volumétrico mostrados en función del tiempo de proceso continuo.

FIG. 15: Ejemplo de rendimiento del dispositivo inventivo B. Rendimiento y caída de presión con respecto a cerca de 100 ciclos de adsorción/desorción consecutivos con adsorbente convectivo (proteína diana: variante del factor de coagulación de la sangre FVIII genéticamente manipulada; adsorbente convectivo: adsorbente comercial, Mustang Q, Pall Corporation).

FIG. 16: Ejemplo de rendimiento del dispositivo inventivo B. Perfil de UV y de conductividad durante un ciclo de adsorción/desorción típico con adsorbente convectivo (proteína diana: variante del factor de coagulación de la sangre FVIII genéticamente manipulada; adsorbente convectivo: adsorbente comercial, Mustang Q, Pall Corporation).

FIG. 17: Ejemplo de rendimiento del dispositivo inventivo B. Se muestran gel de SDS-PAGE (teñido con plata) de carga = cosecha clarificada que abandona continuamente el sistema de eliminación de partículas (100) y cargada semi-continuamente sobre el sistema de adsorbente convectivo (400) y eluato de adsorción/desorción típico. Proteína diana: variante del factor de coagulación de la sangre FVIII genéticamente manipulada; adsorbente convectivo: adsorbente comercial, Mustang Q, Pall Corporation). El eluato se diluyó de nuevo a la concentración de carga antes de ejecutar sobre el gel.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Excepto como se define explícitamente en el presente documento, la terminología usada en la presente solicitud es estándar dentro de la materia. Las siguientes definiciones de ciertos términos se proporcionan en el presente documento para asegurar la claridad y concreción al significado de las reivindicaciones.

Unidades, prefijos y símbolos pueden indicarse en su forma aceptada por el SI. Los intervalos numéricos citados en el presente documento incluyen los números que definen el intervalo e incluyen y son de apoyo de cada número entero dentro del intervalo definido. A menos que se indique lo contrario, los términos “un” o “una” deben interpretarse como que significan “al menos uno de”.

El término “clarificación” y “clarificado” significan la eliminación de materia en partículas de una disolución de manera que la disolución restante pase a través de una membrana de 0,2 µm.

El término “fermentación por perfusión continua” se refiere a un sistema de fermentación en estado estacionario o proceso que opera sin interrupción y en el que las células o microorganismos se mantienen en cultivo en la fase de crecimiento exponencial por la adición continua de medio fresco que se equilibra por la eliminación de suspensión de células del biorreactor.

Los términos “cultivar”, “hacer crecer”, “mantener”, “soportar” y “expandir” son sinónimos que significan que las células siguen viables y son capaces de producir progenie.

El término “concentración”, en su forma verbal, significa la eliminación de agua de una disolución de forma que aumente la cantidad de una molécula de interés por volumen de disolución restante.

El término “polarización por concentración” significa la acumulación de moléculas retenidas (capa de gel) sobre la superficie de la membrana producida por una combinación de factores: presión transmembrana, velocidad de flujo cruzado, viscosidad de la muestra y concentración de soluto.

El término “continuo” significa sin interrumpir en el tiempo, secuencia y/u operación durante periodos de tiempo prolongados. Como se usa en referencia a los procesos de fermentación, clarificación y filtración de la presente invención, “continuo” significa que los procesos están físicamente y logísticamente integrados para permitir la operación sin interrupción durante un periodo de tiempo prolongado suficiente para producir un aislado de producto estéril, libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado que contiene la proteína de interés. El término continuo, como se usa en referencia a los procesos de la invención, también se entiende que significa que un proceso no se realiza en un modo por lotes o en un modo verdaderamente continuo. Los procesos de la presente

invención son capaces de operación continua, por ejemplo, durante periodos prolongados que oscilan de 1 día a varios meses sin interrumpir la operación o secuencia de los procesos. Como se usa en la presente invención, los procesos operan durante un periodo continuo superior a 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas, o 3, 4, 5, 6 o más meses.

5 Los términos “semi-continuo” e “intermitente” significan que uno o más procesos o elementos de un sistema integrado operan en un modo discontinuo o por lotes, mientras que otros procesos o elementos del sistema integrado operan en un modo continuo. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, el proceso de purificación es un proceso de adsorción/desorción convectiva, que normalmente requiere adsorción de la mezcla heterogénea de un sustrato de adsorción, produciendo con el tiempo la saturación del sustrato, y que requiere la terminación del proceso de adsorción y desorción o liberación de la fracción unida. Un proceso tal es inherentemente intermitente, aunque capaz de ser integrado con procesos aguas arriba que son continuos.

15 El término “adsorción/desorción convectiva” significa un proceso cromatográfico en el que la transferencia de masa se produce principalmente por convección. La adsorción/desorción convectiva es un proceso en el que una fracción de una mezcla que contiene una molécula de interés se separa de otra fracción de la mezcla, por medio de adsorción de una fracción a un sustrato, seguido de desorción de esa fracción del sustrato.

20 El término “flujo cruzado” o “flujo cruzado de fluido” significa el flujo del fluido a través de la parte superior de la superficie de la membrana.

25 El término “integrado”, como se usa en referencia a múltiples sistemas y/o procesos, significa que los sistemas y/o procesos están físicamente y lógicamente conectados de manera que constituyen un sistema unificado capaz de operar continuamente. En el contexto del sistema de la presente invención, que se refiere a un sistema continuo o semi-continuo integrado para producir una proteína libre de partículas, concentrada y parcialmente purificada de interés, un sistema integrado conectará diferentes componentes directamente y de un modo suficiente para mantener condiciones estériles entre los diferentes componentes del sistema.

30 Los términos “medios” (plural) y “medio” (singular) son sinónimos y se usan indistintamente en el presente documento, y el uso de una forma del término no implica la exclusión de la otra forma.

35 El término “mezcla” significa una combinación heterogénea de moléculas y compuestos que contienen una molécula de interés, tales como una proteína, y diversos contaminantes. Una mezcla preferida de la presente invención es un fluido de cultivo de tejido que comprende una mezcla heterogénea de proteínas que incluye una proteína exógena de interés, que se obtiene inicialmente a partir de un proceso de fermentación por perfusión continua.

40 El término “capa de gel” significa la capa microscópicamente delgada de moléculas que puede formarse sobre la parte superior de una membrana. Puede afectar la retención de moléculas, obstruyendo la superficie de la membrana y reduciendo así el flujo de filtrado, o, en operación de flujo constante, aumentando la TMP.

45 El término “molécula de interés” significa partículas u otras especies de molécula que van a separarse de una disolución o suspensión en un fluido (por ejemplo, un líquido). Las partículas o moléculas de interés se separan del fluido y, en la mayoría de los casos, de otras partículas o moléculas en el fluido. El tamaño de la molécula de interés que va a separarse determinará el tamaño de poro de la membrana que va a utilizarse. Preferentemente, las moléculas de interés son de origen biológico o bioquímico o se producen por procesos transgénicos o *in vitro* e incluyen proteínas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Ejemplos de orígenes de corriente de alimentación preferidos incluyen cultivo de células de mamífero y cultivo de células de microorganismos tales como bacterias, hongos y levadura. Debe también observarse que las especies que van a separarse por filtración incluyen polipéptidos no deseables, proteínas, componentes celulares, ADN, coloides, micoplasma, endotoxinas, virus, hidratos de carbono, y otras moléculas de interés biológico, tanto glucosiladas como no.

50 El término “permeado” se usa sinónimamente con filtrado.

55 El término “aislado de producto” significa un producto libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado que contiene una proteína de interés. Un aislado de producto es un producto que ha alcanzado un grado de purificación y concentración comparable al alcanzado por un proceso de ultrafiltración o de adsorción/desorción convectiva. Un aislado de producto no es necesariamente homogéneo, pero se purificará sustancialmente con respecto al producto a granel inicial producido por el proceso de fermentación.

60 El término “velocidad de flujo específica” se usa indistintamente con el término “flujo de filtrado” ya que se refiere al filtrado. La velocidad de flujo del retenido específica es la velocidad de flujo del retenido normalizada al área de la membrana usada.

65 Como se usa en referencia al flujo, el término “sustancialmente constante” significa que el flujo se mantiene a un nivel generalmente constante durante un periodo sustancial durante el transcurso de la filtración.

El término “fluido de cultivo de tejido” significa una mezcla heterogénea de componentes derivada de un medio de cultivo de tejido. En aspectos preferidos de la invención, el fluido de cultivo de tejido se deriva de un proceso de fermentación por perfusión continua. Un fluido de cultivo de tejido “clarificado” es un fluido de cultivo de tejido que se ha prefiltrado para eliminar residuos de célula y otras macromoléculas grandes.

El término “presión transmembrana” y su acrónimo “TMP” significan la presión promedio aplicada desde el lado de alimentación hacia el filtrado de la membrana. TMP se calcula por $TMP [bar] = [(PF + PR)/2] - Pf$ en la que PF es la presión de alimentación, PR es la presión del retenido y Pf es la presión del filtrado.

El término “recuperación” significa la cantidad de una molécula de interés que puede recuperarse después del procesamiento. Normalmente se expresa como un porcentaje de material de partida o rendimiento.

El término “retenido” significa la porción de la muestra que no pasa a través de la membrana, también conocida como el concentrado.

El término “ultrafiltración” significa una forma de filtración que usa membranas microporosas o semipermeables para separar preferencialmente fluidos o iones basándose en el tamaño diferencial o peso molecular. La ultrafiltración normalmente se usa para separar por filtración moléculas que tienen un peso molecular mayor de aproximadamente 10.000 dalton.

La presente invención se refiere a un proceso integrado, continuo y estéril que comprende fermentación por perfusión continua, eliminación de partículas y purificación/ concentración. En un aspecto de la invención, el proceso comprende filtrar la mezcla de cultivo de tejido por un proceso de separación que separa selectivamente la proteína de interés de la mezcla en un punto establecido operacional por debajo del punto de transición de la proteína en la región dependiente de la presión de la curva de flujo frente a TMP para producir un aislado de producto estéril, libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado, en el que la velocidad de flujo específica a través del proceso de separación se mantiene sustancialmente constante a un nivel inferior al punto de transición de la proteína.

En otro aspecto de la invención, el proceso es un proceso continuo que comprende: (a) producir continuamente por fermentación por perfusión continua una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea que contiene una proteína de interés; (b) transferir continuamente la mezcla de fluido de cultivo de tejido a un proceso de eliminación de partículas integrado con el sistema de fermentación por perfusión continua; (c) eliminar continuamente contaminantes en partículas del fluido de cultivo de tejido en el proceso de eliminación de partículas para producir continuamente un fluido de cultivo de tejido clarificado que contiene la proteína de interés; (d) transferir continuamente el fluido de cultivo de tejido clarificado a un proceso de purificación integrado con el sistema de eliminación de partículas, en el que el proceso de purificación continuo es ultrafiltración y el fluido de cultivo de tejido clarificado se filtra a una velocidad de flujo específica que produce una concentración de pared inferior al 20 % superior a una concentración de retenido; y (e) separar continuamente la proteína de interés del fluido de cultivo de tejido clarificado en el sistema de purificación para producir continuamente un aislado de producto estéril, libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado que contiene la proteína de interés.

En otro aspecto más el proceso es un proceso semi-continuo que comprende: (a) producir continuamente por fermentación por perfusión continua una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea que contiene una proteína de interés; (b) transferir continuamente la mezcla de fluido de cultivo de tejido a un proceso de eliminación de partículas integrado con el sistema de fermentación por perfusión continua; (c) eliminar continuamente contaminantes en partículas del fluido de cultivo de tejido en el proceso de eliminación de partículas para producir continuamente un fluido de cultivo de tejido clarificado que contiene la proteína de interés; (d) transferir continuamente el fluido de cultivo de tejido clarificado a un recipiente amortiguador integrado con el proceso de eliminación de partículas; (e) transferir intermitentemente el fluido de cultivo de tejido clarificado a un proceso de purificación integrado con el recipiente amortiguador; y (f) separar la proteína de interés del fluido de cultivo de tejido clarificado en el sistema de purificación para producir un aislado de producto estéril, libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado que contiene la proteína de interés, en el que la velocidad de flujo específica de la mezcla a través del proceso de fermentación por perfusión continua y proceso de eliminación de partículas continuo se mantiene sustancialmente constante, y en promedio es igual al caudal promediado con el tiempo del proceso de purificación semi-continuo integrado.

Dispositivos para poner en práctica los métodos de la invención

La presente invención también se refiere a un aparato para separar una proteína de interés de una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea. Generalmente, el aparato comprende: (a) un sistema de fermentación por perfusión continua; (b) un sistema de eliminación de partículas continuo integrado con el sistema de fermentación por perfusión; y (c) un sistema de purificación continuo que es ultrafiltración integrada con el sistema de eliminación de partículas, en el que el aparato está adaptado para mantener condiciones estériles. En otro aspecto de la invención, el aparato comprende: (a) un sistema de fermentación por perfusión continua; (b) un sistema de eliminación de partículas continuo integrado con el sistema de fermentación por perfusión; y (c) un sistema de purificación

intermitente que es ultrafiltración integrada con el sistema de eliminación de partículas, en el que el aparato está adaptado para mantener condiciones estériles.

5 El proceso y aparato de la invención están adaptados para permitir el procesamiento continuo de una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea a una velocidad de flujo sustancialmente constante. En un aspecto particular de la invención, el proceso y aparato de la invención están adaptados para permitir el procesamiento continuo de una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea a una velocidad de flujo sustancialmente constante por debajo del punto de transición de la proteína en la región dependiente de la presión de la curva de flujo frente a TMP durante un periodo continuo y durante todo el proceso de purificación.

10 En realizaciones específicas, la invención proporciona dos dispositivos novedosos (A, B) que están cada uno compuesto de 3 elementos distintos, pero completamente integrados, todos los cuales tienen una función esencial y juntos forman una plataforma de sistema de aislamiento de proteínas continua únicamente eficaz que resuelve los problemas con el estado de la técnica descritos anteriormente.

15 Los tres elementos distintos de cada dispositivo son en primer lugar un sistema de eliminación de partículas continuo integrado (100), en segundo lugar un recipiente amortiguador estéril (200) y en tercer lugar un sistema de concentración/purificación integrado (300,400, respectivamente). Los tres elementos y así los novedosos dispositivos y métodos de uso desarrollados de estos dispositivos se describen en detalle más adelante.

20 Para proporcionar la concentración/purificación continua o semi-continua integrada del producto de proteína, el dispositivo inventivo A (del que se muestran dos realizaciones en la Figura 2) comprende un sistema de ultrafiltración estéril continua integrada (300), mientras que el dispositivo inventivo B (del que se muestran dos realizaciones en la Figura 3) comprende un sistema de adsorción/desorción convectiva semi-continua integrado (400).

25 Los dispositivos de la invención están directamente integrados con uno o más fermentadores de perfusión continuos y así forman una plataforma de fabricación integrada continua novedosa.

30 Dispositivo A

Sistema de eliminación de partículas continuo integrado (100)

35 La Figura 2 muestra 2 realizaciones del dispositivo inventivo A. El sistema de eliminación de partículas continuo integrado (100) está directamente conectado con el lado de cosecha del sistema de fermentación por perfusión continua (1).

40 La Figura 4 muestra una representación esquemática más detallada de una realización del sistema de eliminación de partículas continuo integrado (100) inventivo que consiste en una bomba (101), un manómetro o transmisor de presión, respectivamente (107), un colector de conexión (102) y un ensamblaje de varios trenes de filtración (103). Todos los componentes están conectados con tubería flexible y/o tubería dura.

45 La bomba (101) es una bomba peristáltica convencional, que permite el bombeo suave de la cosecha de cultivo celular sin ninguna parte giratoria o junta puestas en contacto con el producto estéril. La bomba y la tubería de la bomba están dimensionadas para suministrar la velocidad de flujo de cosecha deseada del sistema de fermentación de cultivo celular, que es hasta 15 volúmenes de biorreactor por día, por ejemplo hasta 9,4 litros/hora para un fermentador de 15 litros y hasta 125 litros/hora para un fermentador de 200 litros.

50 El manómetro o transmisor de presión (107) se diseña de forma que pueda esterilizarse por esterilización en autoclave o irradiación. En el presente diseño se usan tanto un transmisor piezorresistivo reutilizable en una carcasa de acero inoxidable como un manómetro de acero inoxidable reutilizable. Sin embargo, mejoras futuras pueden incluir el uso de transmisores desechables que pueden esterilizarse fácilmente por irradiación.

55 En una presente realización, el colector de conexión (102) consiste en tubería flexible, con abrazaderas para tubería (o válvulas) y conectores estériles apropiados para permitir la conexión de ensamblajes de trenes de filtración adicionales sin comprometer la esterilidad del sistema. Preferentemente, los diámetros de la tubería están dimensionados para dar velocidades de fluido lineales de aproximadamente 2 m/s o menos a las velocidades de flujo deseadas, evitando así altas contrapresiones y cizallamiento. En otra presente realización, en lugar de los conectores estériles se usan piezas de tubería flexible especiales que pueden estar soldadas con soldadores de tubería comerciales sin comprometer la esterilidad. Tales piezas de tubería están hechas de PVC u otros polímeros adecuados.

60 El ensamblaje de trenes de filtración (103) consiste en al menos dos, preferentemente múltiples trenes de filtración idénticos (como se muestra en el esquema), con solo uno de los trenes de filtración abierto en cualquier momento dado, como se muestra como un ejemplo en la Figura 4 (105).

Cada tren de filtración consiste en al menos un filtro, preferentemente un pre-filtro y un filtro final en serie (como se muestra en la Figura 4). Si se requiere aumentar la capacidad para una aplicación específica, cada tren de filtración (105, 106, etc.) también puede consistir él mismo en múltiples filtros o trenes de filtración en paralelo (no mostrado).

5 En una realización de la invención mostrada en la Figura 4, el segundo tren de filtración del ensamblaje (106) se cierra por un disco de rotura sensible a la presión, o perno de rotura, respectivamente (104). En operación, la función del disco de rotura, o perno de rotura, es abrir automáticamente la trayectoria de flujo al segundo tren de filtración (107) una vez la presión en el primer tren de filtración (105) alcanza un límite especificado, asegurando así la
10 continuación ininterrumpida del proceso de filtración. Los discos de rotura o pernos de rotura comercialmente disponibles se utilizan en el sistema inventivo, que se usan de otro modo para proporcionar alivio de presión de seguridad. En una presente realización se usan discos de rotura o pernos de rotura con un límite de presión de rotura especificado de no más de 16 psi, que ha demostrado ser muy útil. Sin embargo, es posible un intervalo de límite de presión especificado.

15 Cada tren de filtración adicional del ensamblaje de trenes de filtración también está separado por una válvula manual o automática y otro disco de rotura o perno de rotura. Una vez el segundo tren de filtración (106) está en funcionamiento, la válvula al siguiente disco de rotura o perno de rotura, respectivamente, se abre, de manera que el siguiente tren de filtración puede actuar de apoyo, etc.

20 En una realización alternativa, las válvulas automáticamente accionadas se usan exclusivamente, y en operación, un sistema de control activa las válvulas basándose en la entrada de un sensor de presión piezorresistivo (107) que también puede esterilizarse por esterilización en autoclave. Sin embargo, los solicitantes descubrieron que el presente diseño que comprende el disco de rotura o perno de rotura, respectivamente, proporciona excelente robustez en la operación a largo plazo.

25 La finura del filtro final es al menos 3 μm o más pequeña, preferentemente 0,45 μm y todavía preferentemente 0,2 μm . El tren de filtración (6) en funcionamiento retiene, por tanto, todas las células restantes, además de residuos de células relevantes y otras partículas, produciendo una corriente de salida libre de partículas (9), el fluido de cultivo de tejido clarificado (cTCF).

30 Pueden usarse diferentes materiales de filtro comercialmente disponibles. En el diseño actual se usan cápsulas de filtro desechables, tales como cápsulas de pre-filtro Sartopure o Sartoclear (Sartorius, Goettingen) y cápsulas de filtro Sartobran (Sartorius, Goettingen), que pueden esterilizarse por esterilización en autoclave o irradiación.

35 Como un ejemplo de una presente realización del dispositivo inventivo, diseñado para una velocidad de flujo de 1 litro/min, cada tren de filtración (105, 106, etc.) del ensamblaje (103) consiste en 3 cápsulas de pre-filtro de 30" (Kleenpak Ultipleat, Pall Corp., finura de 4,5 μm , 0,75 m^2 cada una) seguido de 3 cápsulas de filtro final de 20" (Sartobran P, Sartorius, finura de 0,45 $\mu\text{m}/0,2 \mu\text{m}$, 1,3 m^2 cada una). Esta realización particular se ha encontrado particularmente útil para la fabricación a gran escala de factor de coagulación de la sangre VIII recombinante,
40 además de variantes de FVIII genéticamente manipuladas que incluyen FVIII con dominio B deletado.

45 Sin embargo, los solicitantes han descubierto que si se usa el dispositivo y método inventivo, la eficiencia de eliminación de partículas con una variedad de materiales de filtro y configuraciones disponibles de diferentes fabricantes (Pall, Sartorius, Cuno) mejora coherente y significativamente en comparación con los procesos discontinuos convencionales respectivos.

50 Por tanto, el novedoso dispositivo inventivo y proceso también será beneficioso para su uso con novedosos tipos de filtro y geometrías, por ejemplo, con tipos de filtro que aumentan el área de filtro disponible por cápsula, además de con tipos de filtro que proporcionan un patrón de flujo cruzado u otro medio para minimizar la formación de torta, tal como vibración o rotación de los elementos de filtro.

55 En otra realización del proceso inventivo, el ensamblaje de trenes de filtración (103) solo comprende un tren de filtración de apoyo estéril cerrado por un disco de rotura o perno de rotura, respectivamente, pero todavía múltiples trenes de filtración para la operación. El primer tren de filtración del ensamblaje funciona hasta que se haya procesado un volumen de carga predeterminado especificado, después de lo cual la operación se pasa (manualmente o automáticamente) al siguiente tren de filtración en el ensamblaje. El volumen de carga específico se especifica de manera que bajo condiciones de operación normales no se supere el límite de presión del disco de rotura o perno de rotura. Si, sin embargo, la presión aumenta más de lo usual durante la filtración, por ejemplo debido a una capacidad de filtración inusualmente baja de la cosecha, el tren de filtración de apoyo garantiza de nuevo la filtración continua ininterrumpida, abriéndose una vez se supere la presión especificada. Tras una abertura del tren de filtración de apoyo, la filtración pasa a otro tren de filtración del ensamblaje y se instala otro tren de filtración de apoyo con disco de rotura o perno de rotura sin comprometer la esterilidad del sistema.

65 Es bien conocido por aquellos expertos en el campo que para mantener tanto los costes de los filtros como los tiempos de procesamiento para los procesos de eliminación de partículas discontinuos a un mínimo, los trenes de filtración discontinuos necesitan estar dimensionados para tener la menor área de filtro posible requerida para

proporcionar la velocidad de flujo absoluta deseada (en litros/hora) y la máxima presión. La velocidad de flujo absoluta deseada tiene que ser a su vez suficientemente alta para proporcionar tiempos de procesamiento factibles para el volumen de lote deseado. Esto necesita inherentemente una alta velocidad de flujo específica (en litros/hora/m² de área de filtro).

5 A diferencia de un sistema de filtración discontinuo optimizado comparable, el dispositivo inventivo se diseña para velocidad de flujo específica varias veces más baja, que se mantiene constante (en litros/hora/m² de área de filtro instalada) de manera que la velocidad de flujo absoluta sea igual a la velocidad de flujo de cosecha de la fermentación por perfusión continua.

10 Los solicitantes descubrieron inesperadamente que a tales velocidades de flujo específicas bajas el volumen que puede procesarse a través de un filtro es desproporcionalmente superior a las velocidades de flujo ajustadas en los procesos discontinuos.

15 Es importante observar que en los procesos de aislamiento discontinuos convencionales tales velocidades de flujo específicas bajas no serían factibles debido a tanto las áreas de filtración extremas (y así los costes) como a la velocidad de flujo absoluta demasiado baja. Esto es principalmente debido a que la mayor parte del tiempo el equipo de eliminación de partículas discontinuo está inactivo mientras que la cosecha está siendo recogida para el siguiente lote. Además, el sorprendente aumento desproporcionado en la capacidad del filtro alcanzable del método inventivo permite una reducción significativa en el consumo del filtro y así los costes de fabricación.

Recipiente amortiguador (200)

25 La salida del sistema de eliminación de partículas continuo integrado está directamente y constantemente conectada a un recipiente amortiguador (201), como se muestra en la Figura 2. Este recipiente amortiguador es un recipiente estéril, tal como una bolsa desechable o un recipiente de acero inoxidable con al menos un puerto de entrada y un puerto de salida, el último preferentemente en el fondo del recipiente. Puede utilizarse un amplio intervalo de tamaños y diseños del recipiente. Sin embargo, el recipiente amortiguador está preferentemente dimensionado para ser pequeño en comparación con el caudal volumétrico del sistema para mantener el tiempo de residencia del producto en el recipiente a un mínimo, es decir, por debajo de 24 horas, preferentemente por debajo de 8 horas, y todavía preferentemente por debajo de 4 horas.

30 Los solicitantes descubrieron que tales bajos tiempos de residencia del producto, únicamente posibles debido a los dispositivos inventivos, permiten un aumento significativo en el rendimiento para productos de proteína inherentemente inestables, resolviendo así uno de los problemas del estado de la técnica.

35 En algunas realizaciones de los dispositivos inventivos, el recipiente amortiguador se localiza sobre una balanza o celda de carga (202), como se muestra para el dispositivo B1 y B2 en la Figura 3. Esta balanza o celda de carga proporciona una señal del peso a un sistema de control computerizado (no mostrado).

40 Además, en una realización de los dispositivos inventivos (B2), un recipiente de tampón (204) está conectado mediante una bomba peristáltica (203) al recipiente amortiguador. En operación, esta configuración se usa para ajustar las propiedades de la corriente de cosecha libre de partículas, tales como la conductividad (fuerza iónica) o pH, añadiendo tampón o diluyente adecuado. En este caso se usan un sistema de mezcla opcional (205) y sensores para monitorizar la condición deseada (206), tal como el pH o la conductividad. En el presente diseño se usa un agitador magnéticamente acoplado; sin embargo, también podrían usarse otros sistemas de mezcla, tales como agitadores o dispositivos de pulsación.

Concentración/purificación continua integrada (300)

50 El dispositivo A, del que se muestran 2 realizaciones en la Figura 2, comprende un sistema de ultrafiltración estéril continua integrada (300). Las realizaciones del sistema de ultrafiltración estéril continua comprenden una bomba de recirculación (301) y bucle de recirculación (306), uno o más módulos de ultrafiltración de flujo cruzado estériles (303), una bomba de permeado (305), un recipiente receptor de permeado estéril (307) sobre una balanza o celda de carga (309) y una bomba de retenido (311). Además, comprende instrumentación en forma de un manómetro o transmisor de presión de entrada (302), manómetro o transmisor de presión de permeado (304), manómetro o transmisor de presión de salida (308), además de un medidor de flujo de recirculación (310). En operación, la salida del sistema (312) proporciona una corriente de concentrado continua y producto de proteína parcialmente purificada, que puede recogerse continuamente, congelarse o procesarse adicionalmente.

60 La realización inventiva A2 comprende además un recipiente de tampón o diluyente (314), una bomba peristáltica de adición de tampón/diluyente (313), además de sensores de flujo a través para monitorizar el acondicionamiento del concentrado en el bucle de recirculación, tal como sensores para el pH y la conductividad (315, 316). En operación, esta configuración se usa para ajustar las propiedades de la corriente de cosecha libre de partículas, tales como la conductividad (fuerza iónica) o el pH, añadiendo tampón o diluyente adecuado. Esta configuración también puede usarse para añadir estabilizadores de proteína. Aunque en la realización inventiva A2 el propio bucle de recirculación

actúa de cámara de mezcla, el acondicionamiento también puede realizarse alternativamente usando una configuración de recipiente amortiguador como se muestra para el dispositivo B (realización B2), que comprende los componentes (203, 204, 205, 206) como se trata después en la presente divulgación (véase la descripción del dispositivo B).

Las realizaciones del dispositivo inventivo también comprenden un sistema de control de registro de datos y programable que registra las señales de datos de entrada de la instrumentación (tales como, pero no se limitan a, presiones, velocidad de flujo, peso del recipiente, pH, conductividad) y controla las velocidades de la bomba según un algoritmo de control predefinido.

Todas las bombas (301, 305, 311, 313) son bombas peristálticas, que permiten el bombeo de las corrientes de fluido respectivas sin ninguna parte giratoria o junta puesta en contacto con la corriente de producto estéril. Los solicitantes descubrieron que esto es preferible para proporcionar operación a largo plazo estéril robusta. Sin embargo, en principio pueden usarse otros diseños de bomba estéril. La bomba de recirculación (301) y su tubería de bomba están diseñadas para permitir el robusto ajuste de las velocidades de flujo cruzado deseadas de entre 80 y 800 litros/hora por m² de área de membrana instalada, dependiendo de las características de transferencia de masa del módulo de ultrafiltración usado. La bomba de permeado está dimensionada para permitir el robusto y preciso ajuste de un flujo de permeado específico de entre el 90 % y el 99 % de la velocidad de flujo de cosecha de la fermentación por perfusión continua. La bomba de retenido está dimensionada para permitir un robusto y preciso ajuste del flujo de retenido de entre el 1 % y el 10 % de la velocidad de flujo de cosecha de la fermentación por perfusión continua.

Se usan módulos de ultrafiltración encapsulados (303) para permitir la robusta operación estéril, y se esterilizan por esterilización en autoclave o irradiación. El corte de peso molecular nominal óptimo se elige basándose en el peso molecular del producto de proteína de interés y tiene que confirmarse por experimentos estándar conocidos para aquellos expertos en la materia. Puede usarse una variedad de materiales de membrana, tales como poliétersulfona, poliétersulfona hidrofílica o celulosa regenerada, en tanto que el módulo de membrana entero pueda esterilizarse por irradiación y/o esterilización en autoclave sin dañar la membrana. Se espera que los materiales hidrófilos puedan aumentar la eficiencia debido a sus menores tendencias a la incrustación.

Los solicitantes descubrieron que el dispositivo A es únicamente eficaz si el área de membrana de ultrafiltración total instalada en metros cuadrados es igual a un intervalo de entre 0,1 y 2 veces la velocidad de flujo volumétrica de la cosecha de la fermentación por perfusión continua en litros/hora. Por ejemplo, para una velocidad de flujo de cosecha de perfusión de 1 litro/hora, el área de membrana total instalada debe estar entre 0,1 y 2 metros cuadrados. Los solicitantes descubrieron que el dispositivo A es todavía más eficaz si el área de membrana de ultrafiltración instalada en metros cuadrados es igual a un intervalo de entre 0,3 y 1 veces la velocidad de flujo volumétrica de la cosecha de la fermentación por perfusión continua en litros/hora.

En una realización de la invención se usan módulos de membrana de fibra hueca "desechables" comercialmente disponibles (GE Healthcare, anteriormente Amersham Biosciences). Sin embargo, puede usarse una variedad de membranas encapsuladas y diseños de módulo, tal como módulos enrollados en espiral, casetes encapsulados o cápsulas con transferencia de masa potenciada debido a patrones de flujo secundario (por ejemplo, flujo de vórtex), elementos giratorios (por ejemplo, filtros de disco dinámico) o filtros vibratorios. Se espera que especialmente puedan usarse beneficiosamente casetes de ultrafiltración encapsulados en los dispositivos inventivos, ya que proporcionan altos coeficientes de transferencia de masa a velocidad de flujo cruzado requerida relativamente baja, reduciendo así la capacidad de la bomba, mientras que la complejidad del sistema y los costes de inversión se mantienen bajos.

El dispositivo inventivo permite no solo operación continua, sino también perfectamente estéril, a diferencia de solo operación aséptica. Los solicitantes lograron esto diseñando todos los componentes del sistema en contacto con el producto para resistir no solo a la limpieza, sino también a la esterilización por esterilización en autoclave, tratamiento con vapor en su sitio o irradiación gamma. En las presentes realizaciones se usan módulos encapsulados desechables para la eliminación de partículas continua (100), además de la ultrafiltración continua (300). Las bombas peristálticas se usan para evitar cualquier contacto del producto con elementos giratorios y juntas mecánicas. Además, en las presentes realizaciones se usan tubería desechable y ensamblajes de bolsa en lugar de tubería dura. Los componentes que se ponen en contacto con el producto desechables (por ejemplo, tubería, bolsas, módulos) o grupos de componentes se pre-ensamblan y se esterilizan juntos, simplificándose así la puesta en marcha y operación. Los sistemas se diseñan para mantener cualquier posible abertura del sistema estéril al entorno (por ejemplo, campana de flujo laminar), como para muestreo, intercambio de bolsa o de instrumentación a un mínimo. En las presentes realizaciones del dispositivo, los colectores están diseñados redundantes para permitir la conmutación de un componente estéril (por ejemplo, bolsa receptora de producto) al siguiente sin abertura. El intercambio adicional de tuberías, módulos o bolsas se realiza preferentemente usando soldadores de tubería estéril en vez que conectores estériles.

Otras realizaciones futuras de dispositivos inventivos también podrían comprender componentes tales como recipientes de acero inoxidable, carcasas de filtro o tubería que pueden esterilizarse en su sitio, solos o en

combinación con componentes desechables, en tanto que se asegure la robustez y esterilidad en la operación a largo plazo.

5 Realizaciones adicionales del dispositivo inventivo A se diseñan para procesar material a partir de múltiples fermentadores en plantas de fabricación más grandes (A3). Un ejemplo se muestra esquemáticamente en la Figura 5. Realizaciones adicionales se diseñan para aumentar el factor de concentración global y el rendimiento de separación combinando 2 etapas de sistemas de ultrafiltración continua (300) en serie (A4, mostrado esquemáticamente en la Figura 5).

10 Descripción del método de uso del dispositivo A

15 Las fermentaciones por perfusión continua operan durante un largo periodo de tiempo (una campaña), normalmente entre 2 semanas y 6 meses o más. El fluido de cultivo de tejido (TCF) que contiene producto, células y residuos celulares se procesa continuamente usando el dispositivo A. Se produce una corriente de producto estéril, libre de partículas, concentrada y parcialmente purificada (el "aislado de producto") y abandona continuamente el dispositivo en su salida (312). Usando la bomba (101) del sistema de eliminación de partículas estéril continuo (100) la cosecha se bombea continuamente a través del ensamblaje de filtración (103) a la velocidad de flujo de cosecha de perfusión deseada Q_h de la fermentación.

20 La corriente de salida del sistema de filtración continua, es decir, el fluido de cultivo de tejido clarificado (cTCF), entra continuamente en el recipiente amortiguador (201). A partir del recipiente amortiguador el cTCF se procesa continuamente por un sistema de ultrafiltración estéril continua (300) a una velocidad de flujo igual a la velocidad de flujo procedente de la fermentación por perfusión continua. Debido al pequeño dimensionamiento del recipiente amortiguador con respecto a las velocidades de flujo ajustadas, el tiempo de residencia medio del producto en el
25 recipiente se mantiene a un mínimo, es decir, por debajo de 12 horas, preferentemente por debajo de 4 horas y todavía preferentemente por debajo de 2 horas.

30 El flujo cruzado adecuado, y así la transferencia de masa, se ajusta en el módulo de ultrafiltración mediante la bomba de recirculación (301). La velocidad de flujo del retenido se ajusta y se controla usando la bomba de retenido (311), dando así una velocidad de flujo constante y continua Q_i del aislado de producto concentrado que abandona el dispositivo A en su salida (312). La bomba de permeado (305) se usa para ajustar y controlar la velocidad de flujo Q_p del permeado, que se saca continuamente del lado de permeado del (de los) módulo(s) de ultrafiltración, y que consiste en agua y componentes de disolución suficientemente pequeños para pasar a través de la membrana de ultrafiltración (por ejemplo, sales, proteínas pequeñas).

35 Las velocidades de flujo del permeado (Q_p) y retenido/aislado (Q_i) se ajustan cuidadosamente y se controlan para coincidir con la velocidad de flujo de cosecha Q_h de la fermentación de manera que:

$$Q_p + Q_i = Q_h$$

40 Al mismo tiempo, las velocidades de flujo se ajustan y se controlan de manera que se logre un factor de concentración deseada c_f cumpliendo:

$$Q_i = 1/c_f * Q_h$$

45 Por ejemplo, para lograr un factor de concentración de producto deseado de 10 veces en el aislado con respecto a la concentración de cosecha inicial, Q_i se controla a $Q_i = 1/10 * Q_h$ usando la bomba de retenido/aislado (311), mientras que Q_p se controla a $Q_p = 0,9 * Q_h$ usando la bomba de permeado (305).

50 Como las velocidades de flujo están controladas por las bombas (305) y (311), el sistema de ultrafiltración extrae automáticamente un flujo de $Q_p + Q_i$ del recipiente amortiguador pequeño (201).

55 En caso de uso de la realización A2 (véase la derecha de la Figura 2), una corriente de tampón estéril o agua para inyección del recipiente 314 se añade al sistema de ultrafiltración continua continuamente a una velocidad de flujo constante Q_b usando la bomba de adición de tampón (313). Por tanto, las condiciones del aislado pueden ajustarse libremente y continuamente, por ejemplo, en términos de fuerza iónica, pH, adición de estabilizadores, etc. Las velocidades de flujo se controlan, por tanto, a

$$Q_p + Q_i = Q_h + Q_b$$

60 Además, pueden elegirse relaciones de velocidad de flujo de manera que se logre un factor de concentración deseado c_f cumpliendo $Q_i = 1/c_f * (Q_h + Q_b)$. Alternativamente, este proceso puede usarse para solo alterar condiciones (por ejemplo, pH, conductividad), estableciendo $Q_i = Q_h + Q_b$.

65 El novedoso método de uso del dispositivo A también contrasta con los procesos discontinuos de UF (estado de la técnica) en términos del punto fijo operacional de la propia ultrafiltración. Los procesos de UF discontinua

convencionales se diseñan para un cierto caudal a través de un área de membrana baja en un corto periodo de tiempo. La UF discontinua es así generalmente operada en el punto de transición de región dependiente de la presión a controlada por la transferencia de masa (véase la Figura 9). Esto conduce a un flujo específico inicial deseablemente alto, que sin embargo disminuye significativamente y rápidamente durante el transcurso de segundos a minutos, a medida que la polarización por concentración conduce rápidamente a contrapresión osmótica y formación de una capa de gel limitante (membrana secundaria). Una alta concentración de pared de macromoléculas tal también conduce a una elevada adsorción de compuestos a la superficie de la membrana interna y externa, es decir, a incrustación de la membrana. Esta incrustación reduciría adicionalmente el flujo de permeado con el tiempo.

Los solicitantes descubrieron sorprendentemente que con el dispositivo A se logran capacidades de carga global muchas veces mayores por área de membrana de ultrafiltración instalada operando en el extremo inferior de la curva de presión-flujo (véase la Figura 9):

La concentración de pared normalizada c_{pared} de un componente completamente retenido puede describirse del siguiente modo:

$$c_{pared} = e^{\frac{J}{k_d}} \cdot c_{masa}$$

con

- J = flujo de permeado específico en litros/hora/m²
- k_d = coeficiente de transferencia de masa en litros/hora/m²
- c_{masa} = concentración del componente en la masa de disolución

Al igual que la UF discontinua, la UF continua opera a coeficiente de transferencia de masa optimizado para minimizar la polarización por concentración. Sin embargo, a diferencia de la ultrafiltración discontinua, los solicitantes ajustan el flujo de permeado J para que esté en el extremo bajo de la curva de presión-flujo (véase la Figura 9). Como resultado de la relación exponencial, la concentración de pared c_{pared} en la superficie de la membrana es, por tanto, significativamente menor que la que sería en la ultrafiltración discontinua. Por ejemplo, la presente realización del método inventivo ajusta un flujo de permeado específico objetivo de aproximadamente 1/10 del coeficiente de transferencia de masa alcanzable, ajustando así una concentración de pared de solo el 10 % por encima de la concentración de masa ajustada (o retenido).

La siguiente Tabla 1 muestra un ejemplo de un método de uso del dispositivo A (realización AI) para el aislamiento continuo de un producto de proteína de un fermentador a escala de desarrollo:

Tabla 1

Ejemplo de método de uso de una presente realización del dispositivo A para el aislamiento continuo de un producto de proteína de fermentación por perfusión continua	
Parámetro operacional	Objetivo
Velocidad de flujo de cosecha Qh de perfusión continua (controlada con bomba 101)	5 litros/hora (120 litros/día)
Velocidad de flujo del permeado QP (controlada con la bomba 305)	4,75 litros/hora
Velocidad de flujo del retenido (aislado de producto) Qi (controlada con la bomba 311)	0,25 litros/hora
Flujo de permeado específica J	2 litros/hora/m ²
Factor de concentración cf	20 veces

Para cada molécula de producto individual, un criterio de vida puede definirse para la configuración de ultrafiltración continua estéril, por ejemplo, basándose en la presión transmembrana. Una vez se supera el límite de presión transmembrana, la configuración de ultrafiltración estéril continua se intercambia a otra configuración idéntica sin comprometer la integridad y esterilidad del sistema. Esto puede hacerse en analogía a la configuración de filtración estéril continua usando tanto colectores como conectores estériles, o usando tubería flexible desechable y soldadores de tubería estériles.

Dispositivo B

Sistema de eliminación de partículas continuo integrado (100)

La Figura 3 muestra 2 realizaciones del dispositivo inventivo B. El sistema de eliminación de partículas continuo integrado (100) está directamente conectado con el lado de cosecha del sistema de fermentación por perfusión

continua (1). Esta parte del dispositivo B es idéntica al dispositivo A (véase la descripción detallada del dispositivo A y la Figura 4, anteriormente).

Recipiente amortiguador (200)

5 La salida del sistema de eliminación de partículas continuo integrado está directamente y constantemente conectada a un recipiente amortiguador (201), como se muestra en la Figura 3. Este recipiente amortiguador es un recipiente estéril, tal como una bolsa desechable o un recipiente de acero inoxidable con al menos un puerto de entrada y un puerto de salida, el último preferentemente en el fondo del recipiente. Puede utilizarse un amplio intervalo de
10 tamaños y diseños del recipiente. Sin embargo, el recipiente amortiguador está preferentemente dimensionado para ser pequeño en comparación con el caudal volumétrico del sistema para mantener el tiempo de residencia del producto en el recipiente bajo, es decir, por debajo de 26 horas, preferentemente por debajo de 12 horas y todavía preferentemente por debajo de 4 horas.

15 En el dispositivo B, el recipiente amortiguador está localizado sobre una balanza o celda de carga (202), como se muestra para las realizaciones B1 y B2 en la Figura 3. Esta balanza o celda de carga proporciona una señal de peso a un sistema de control computerizado (no mostrado).

20 Además, en una realización de los dispositivos inventivos (B2), un recipiente de tampón (204) está conectado mediante una bomba peristáltica (203) al recipiente amortiguador. En operación, esta configuración se usa para ajustar las propiedades de la corriente de cosecha libre de partículas, tales como la conductividad (fuerza iónica) o el pH, añadiendo componentes para modificar las propiedades del cultivo de tejido clarificado recibido del sistema de eliminación de partículas, tal como un tampón o diluyente adecuado, o un estabilizador de proteína adecuado. En este caso, una presente realización también comprende un sistema de mezcla (205) y se usan sensores para
25 monitorizar la condición deseada (206), tal como el pH o la conductividad. En esta presente realización se usa un agitador magnéticamente acoplado; sin embargo, también podrían usarse otros sistemas de mezcla, tales como agitadores o dispositivos de pulsación.

30 En otra realización del dispositivo inventivo 2 se usan recipientes amortiguadores. En cualquier momento dado, un recipiente amortiguador se conecta directamente con el sistema de eliminación de partículas continuo (100), recibiendo así fluido clarificado, mientras que el otro se conecta al sistema de concentración/purificación semi-continuo (400), alimentando así a un ciclo de adsorción/desorción convectiva. La conmutación entre ambos se realiza mediante un sistema de control, usando el peso del recipiente receptor para desencadenar un cambio una vez se alcanza su volumen de llenado máximo.

Concentración/purificación semi-continua integrada (400)

40 El dispositivo B, del que se muestran 2 realizaciones en la Figura 3, comprende un sistema de adsorción/desorción convectiva semi-continua integrada (400).

El sistema de adsorción/desorción convectiva semi-continua integrada está diseñado y dimensionado de manera que su velocidad de flujo de carga (Q_{carga}) sea significativamente superior a la velocidad de flujo del proceso de cosecha por perfusión continua y de filtración continua (Q_h), es decir, $Q_{carga} \gg Q_h$.

45 Las realizaciones del sistema de concentración/purificación semi-continua integrada (400) comprenden una bomba de carga (401), un ensamblaje de válvula multi-puerto (402) y varios recipientes de tampón (404), una válvula de 3 vías (403) conectada a un recipiente receptor de residuos (413) y uno o más módulo(s) de adsorbente convectivo (406), manómetros o transmisores de entrada y salida (405, 408), adicionalmente instrumentación tal como sensor de UV (409), sensores de pH y de conductividad (409, 410), medidor de flujo (412), además de otra válvula de 3 vías (407) conectada también al recipiente de residuos (413) y la salida del eluato producto (414).

50 Las realizaciones del dispositivo inventivo también comprenden un sistema de control de registro de datos y programable (no mostrado) que registra las señales de datos de entrada de la instrumentación (tales como, pero no se limitan a, presiones, UV, pH, conductividad, velocidad de flujo, peso del recipiente amortiguador) y controla las válvulas automatizadas y la bomba según protocolos programados.

55 La bomba de carga (401) es preferentemente una bomba peristáltica para evitar el contacto directo del producto o tampones estériles con cualquier junta o parte mecánica. Los solicitantes descubrieron que esto es preferible para proporcionar una operación a largo plazo estéril robusta. Sin embargo, en principio pueden usarse otros diseños de bomba estéril. La bomba de carga se dimensiona dependiendo del volumen de matriz instalada del adsorbente convectivo (406) para permitir el robusto ajuste de al menos 12 volúmenes de matriz/minuto. Por ejemplo, en una presente realización se usan cápsulas de adsorbente de membrana Mustang (Pall Corp.) que tienen un volumen de matriz de aprox. 0,3 litros. Por tanto, la bomba de carga se dimensiona para permitir velocidades de flujo de carga de hasta 3,6 litros/minuto.

65

La función del ensamblaje de válvula multi-puerto (402) es para permitir la conmutación entre la carga que contiene producto extraída del recipiente amortiguador (201) y cada uno de los tampones estériles y disoluciones de limpieza de recipientes de tampón estéril (404). Las presentes realizaciones del dispositivo B utilizan una serie de válvulas de manguito automáticamente accionadas, manguito que conecta la tubería flexible a cada recipiente de tampón desde el exterior para cerrar y abrir cada línea. Los solicitantes descubrieron que estas válvulas de manguito proporcionan una solución particularmente beneficiosa para el dispositivo B ya que evitan cualquier contacto con el producto y así no necesitan ser limpiadas o esterilizadas. Sin embargo, puede usarse una amplia gama de válvulas comerciales adecuadas para procesamiento estéril y conocidas para aquellos familiarizados con el campo, tales como válvulas de membrana accionadas.

En la presente realización, las válvulas de 3 vías (403, 407) son válvulas de membrana accionadas esterilizables en autoclave. Sin embargo, en principio puede usarse una variedad de válvulas comerciales adecuadas para procesamiento estéril, que incluyen, por ejemplo, válvulas de manguito.

El módulo de adsorbente convectivo (406) contiene una matriz cromatográfica con transferencia de masa predominantemente convectiva del producto a la superficie adsorptiva y, a diferencia de la cromatografía convencional, se esteriliza antes de la operación por esterilización en autoclave, tratamiento con vapor o irradiación. La transferencia de masa predominantemente convectiva permite, a diferencia de la cromatografía en lecho relleno convencional, tiempos de ciclos de adsorción/elución/regeneración muy bajos, que los solicitantes utilizan en el dispositivo inventivo para realizar la operación semi-continua.

En la presente realización del dispositivo inventivo, el adsorbente convectivo (406) consiste en una o más cápsulas de adsorbente de membrana comercialmente disponibles con química de intercambio iónico (Mustang, Pall Corporation o Sartobind, Sartorius). Sin embargo, el dispositivo puede utilizar otros materiales de adsorbente de membrana y geometrías y matrices convectivas novedosas tales como también matrices monolíticas, ya que a diferencia de la cromatografía convencional el relleno de resina se elimina y generalmente pueden encapsularse matrices en módulos listos para uso.

Además, otras químicas, que incluyen matrices de afinidad convectiva que comprenden ligandos de unión a producto específicos, también darán rendimiento únicamente beneficioso en el dispositivo inventivo.

En una realización del dispositivo inventivo se usan múltiples módulos de adsorbente convectivo en el dispositivo en forma de un ensamblaje de trenes de adsorbente convectivo en paralelo, similar al sistema de eliminación de partículas continuo (100). El ensamblaje entero con todos los trenes de adsorbente se esterilizan juntos, permitiendo en la operación la conmutación de un tren de adsorbente a uno nuevo en caso de que el primero alcance el fin de su vida útil, como se determina, por ejemplo, por un criterio predefinido tal como la contrapresión durante la carga o número máximo de ciclos de operación realizados. Cada tren de adsorbente consiste en tanto un módulo individual como múltiples módulos de adsorbente convectivo en paralelo y/o en serie para aumentar la capacidad de unión y/o mejorar la utilización de la capacidad.

Es importante enfatizar que el dispositivo inventivo permite no solo operación continua, sino también perfectamente estéril, a diferencia de solo operación aséptica.

Los solicitantes lograron esto diseñando todos los componentes del sistema en contacto con el producto para resistir no solo a la limpieza, sino también a la esterilización por esterilización en autoclave, tratamiento con vapor en su sitio o irradiación gamma. En las presentes realizaciones se usan módulos encapsulados desechables para la eliminación de partículas continua (100), además de adsorción/desorción convectiva estéril semi-continua (400). Las bombas peristálticas se usan para evitar cualquier contacto del producto con elementos giratorios y juntas mecánicas. Además, en las presentes realizaciones se usan tubería desechable y ensamblajes de bolsa en lugar de tubería dura. Los componentes que se ponen en contacto con el producto desechables (por ejemplo tubería, bolsas, módulos) o grupos de componentes se pre-ensamblan y se esterilizan juntos simplificándose así la puesta en marcha y operación. Los sistemas se diseñan para mantener cualquier posible abertura del sistema estéril al entorno (por ejemplo, campana de flujo laminar), como para muestreo, intercambio de bolsa o de instrumentación a un mínimo. En las presentes realizaciones del dispositivo, los colectores están diseñados redundantes para permitir la conmutación de un componente estéril (por ejemplo, bolsa receptora de producto) al siguiente sin abertura. El intercambio adicional de tuberías, módulos o bolsas se realiza preferentemente usando soldadores de tubería estériles en vez que conectores estériles.

Otras realizaciones futuras de dispositivos inventivos también podrían comprender componentes tales como recipientes de acero inoxidable, carcasas de filtro o tubería que puede esterilizarse en su sitio, sola o en combinación con componentes desechables, en tanto que se asegure la robustez y esterilidad en la operación a largo plazo.

Realizaciones adicionales del dispositivo inventivo B se diseñan para procesar material a partir de múltiples fermentadores en plantas de fabricación más grandes (B3). Un ejemplo se muestra esquemáticamente en la Figura 6. Realizaciones adicionales del dispositivo inventivo B se diseñan para aumentar el factor de concentración global y

el rendimiento de separación combinando múltiples sistemas de adsorción/desorción convectiva (400) en serie, con recipientes amortiguadores estériles respectivos entremedias (200) (véase la Figura 6, B4).

5 Todavía otras realizaciones de dispositivos inventivos se diseñan para aumentar el factor de concentración global y el rendimiento de separación combinando un sistema de ultrafiltración continua (300) en serie con un sistema de adsorción/desorción convectiva semi-continuo (400) mediante un recipiente amortiguador adicional. Un ejemplo de una realización se muestra esquemáticamente en la Figura 7.

10 Descripción de método de uso del dispositivo B

10 Las fermentaciones por perfusión continua operan durante un largo periodo de tiempo (una campaña), normalmente entre 2 semanas y 6 meses o más. El fluido de cultivo de tejido (TCF) que contiene producto, células y residuos celulares se procesa continuamente usando el dispositivo B. Se produce una corriente de producto estéril, libre de partículas, concentrada y parcialmente purificada (el "aislado de producto") y abandona continuamente el dispositivo en su salida (414). Usando la bomba (101) del sistema de eliminación de partículas estéril continuo (100) la cosecha se bombea continuamente a través del ensamblaje de filtración (103) a la velocidad de flujo de cosecha de perfusión deseada Q_h de la fermentación.

20 La corriente de salida del sistema de filtración continuo, es decir, el fluido de cultivo de tejido clarificado (cTCF), entra continuamente en el recipiente amortiguador (201).

25 Siempre que el recipiente amortiguador esté lleno a un nivel predefinido, una señal de peso o de nivel desencadena automáticamente un ciclo de adsorción/desorción del sistema de concentración/purificación semi-continuo estéril integrado. El material recogido en el recipiente amortiguador se carga rápidamente sobre la configuración de adsorbente, es decir, en el plazo de 4 horas, preferentemente en el plazo de 2 horas, y todavía preferentemente en el plazo de 1 hora o menos, vaciando así el recipiente amortiguador.

30 En las presentes realizaciones mostradas en la Figura 3, la recogida del fluido de cultivo de tejido clarificado libre de partículas (cTCF) continúa en todo momento, en el mismo recipiente amortiguador pequeño. El volumen en el recipiente amortiguador pequeño varía, por tanto, entre un valor mínimo y máximo. En otra realización descrita en el texto antes, la recogida alterna entre 2 recipientes amortiguadores idénticos.

35 Mientras que el cTCF continúa recogiéndose en el recipiente amortiguador, el adsorbente cargado se somete a más etapas de un protocolo cromatográfico predefinido, diseñado para desorber el producto objetivo en la forma purificada concentrada y para prepara el adsorbente para el siguiente ciclo de carga. Así, el ciclo global comprende carga, lavado, elución, regeneración y re-equilibrio, cada uno con uno o más tampones adecuados.

40 Como de nuevo las velocidades de flujo durante estas etapas pueden ser altas debido a la naturaleza de los adsorbentes convectivos, el tiempo de ciclo total se mantiene bajo, es decir, inferior a 6 horas, preferentemente inferior a 3 horas y todavía preferentemente inferior a 1,5 horas. Por tanto, el sistema integrado se diseña de manera que la configuración de adsorbente se prepare para el siguiente ciclo de carga antes de que el recipiente amortiguador se llene de nuevo, permitiendo así la operación semi-continua.

45 La siguiente Tabla 2 muestra un ejemplo de un método de uso de una presente realización del dispositivo inventivo B para el aislamiento de factor de coagulación de la sangre VIII recombinante humano (se muestran datos a gran escala). El método demostró ser únicamente beneficioso. Los rendimientos y el comportamiento de cada ciclo de adsorción/desorción fueron similares a discontinuos, aumentando el rendimiento de producto global más del 10 % debido al menor tiempo de residencia del producto y minimizándose así la degradación de producto. El mismo método también ha demostrado ser muy beneficioso para el aislamiento de variantes de FVIII genéticamente manipuladas, que incluyen FVIII con dominio B delecionado, que es significativamente diferente del FVIII de longitud completa en tamaño y otras características. Se espera que también sea útil para la producción de otras proteínas y biomoléculas.

55 El propio protocolo cromatográfico (químicas de tampón y secuencia, volúmenes de carga y velocidades de flujo) puede desarrollarse en experimentos de cromatografía discontinuos para cada molécula individual y puede entonces transferirse fácilmente para ser usado con realizaciones del dispositivo inventivo.

Tabla 2

Ejemplo de método de uso de una presente realización del dispositivo B para el aislamiento continuo de FVIII y variantes de FVIII de fermentación por perfusión continua	
Parámetro	Objetivo
Velocidad de flujo de cosecha Q_h de perfusión continua [1/d]	2000
Recipiente amortiguador: volumen de trabajo máx V_s [1]	200
Volumen de carga [volúmenes de matriz]	600
Volumen de matriz de adsorbente instalada en el dispositivo B [ml]	260

Ejemplo de método de uso de una presente realización del dispositivo B para el aislamiento continuo de FVIII y variantes de FVIII de fermentación por perfusión continua	
Parámetro	Objetivo
Velocidad de flujo de carga [volúmenes de matriz /min]	12
Volumen de carga [l]	156
Tiempo de carga [min]	50
Tiempo cromatográfico total [h] (protocolo que comprende carga, lavado, elución y varias etapas de regeneración/re-equilibrio)	1,5
Tiempo inactivo de adsorbente/ciclo [h]	0,372
Ciclos/periodo de 24 horas	12,8
Tiempo de recogida [h]	1,872
Tiempo de residencia del producto medio aprox. en el dispositivo (tiempo de recogida + tiempo de carga + tiempo de elución)	2,7

Para cada molécula de producto individual se define un criterio de vida para la configuración de adsorbente convectivo, por ejemplo, basándose en la presión durante la carga, o recuperación. Normalmente se especifica y valida un número máximo de ciclos $n_{m\acute{a}x}$. Una vez se ha usado la configuración de adsorbente en operación semi-continua a través de $n_{m\acute{a}x}$ ciclos, se intercambia con otra configuración de adsorbente idéntica sin comprometer la integridad y esterilidad del sistema. En las presentes realizaciones, esto se hace en analogía a la configuración de filtración estéril continua usando tanto colectores como conectores estériles, o usando tubería flexible desechable y soldadores de tubería estériles.

Si se usa la realización de los dispositivos inventivos mostrada en la Figura 3, a la derecha, una corriente de tampón estéril, disolución de ajuste del pH, disolución de estabilizador o agua para inyección se añade tanto continuamente como intermitentemente de un recipiente estéril (204) usando una bomba de adición de tampón (203). Por tanto, las condiciones del cTCF pueden ajustarse libremente, por ejemplo, en términos de fuerza iónica, pH, adición de estabilizadores, etc.

Beneficios de la invención

Los dispositivos inventivos y métodos de uso respectivos de los dispositivos resuelven los problemas de procesos de aislamiento convencionales brevemente expuestos antes (véase Antecedentes generales de la invención).

En todas las realizaciones de los dispositivos A y B y métodos de uso respectivos de los dispositivos, el tiempo de residencia del producto en medio posiblemente perjudicial se minimiza únicamente, que aumenta significativamente el rendimiento y la calidad de productos biológicos complejos inherentemente inestables. Puede aumentarse la capacidad de la planta y reducirse el coste de productos.

Además, los dispositivos y métodos respectivos eliminan la necesidad de instalaciones de salas frías o recipientes enfriados para el almacenamiento intermedio de grandes volúmenes de cosecha, reduciéndose así los costes de inversión de la planta y realizando completamente la ventaja de compacidad y movilidad de la fermentación por perfusión.

Las realizaciones de tanto dispositivos inventivos como métodos respectivos reducen los costes de laboratorio en comparación con el procesamiento discontinuo que requiere mucha mano de obra convencional debido al grado de automatización inherentemente alto. Los novedosos dispositivos permiten operación continua, 24 horas al día, durante largos periodos de tiempo, maximizando el caudal volumétrico y la utilización del equipo.

Además, los dispositivos inventivos eliminan las dificultades logísticas en plantas de uno o múltiples fermentadores. Las realizaciones pueden procesar material de una cualquiera o múltiples fermentaciones de perfusión continua.

Y, lo que es más importante, como los novedosos dispositivos y métodos permiten operación completamente estéril, se eliminan los problemas de cargas microbianas, además de los problemas de endotoxinas, que no podrían lograrse por procesamiento aséptico, seguido de filtración estéril simple.

Además, los dispositivos inventivos permiten evitar o minimizar la necesidad de validación de limpieza debido a la utilización de desechables. Mediante las características únicas de los dispositivos inventivos y métodos, módulos desechables, además de tubería, bolsas y ensamblajes, pueden usarse cada uno durante un largo periodo de tiempo (hasta la duración entera de la campaña), reduciendo así espectacularmente los costes y haciendo la utilización de desechables altamente atractiva desde un punto de vista económico.

Las presentes realizaciones de los dispositivos inventivos A y B y métodos respectivos han demostrado ser especialmente útiles para la fabricación de factor de coagulación de la sangre VIII recombinante, además de versiones genéticamente manipuladas de FVIII que incluyen, pero no se limitan a, FVIII con dominio B delecionado.

Sin embargo, puede esperarse claramente que las invenciones sean similarmente útiles para la producción de otras proteínas y moléculas biológicas, en particular proteínas complejas inherentemente inestables tales como factor VII, factor IX, factor X, y otras.

5 Beneficios del dispositivo A y método respectivo

La Figura 8 muestra un ejemplo del sorprendente aumento de capacidad del filtro que los solicitantes descubrieron para el elemento de eliminación de partículas continua integrada (100).

10 La Figura 10 muestra una distribución del tiempo de residencia típico y tiempo de residencia medio del producto en el sistema de UF continua (300) de una realización del dispositivo inventivo A, como se ha determinado por adsorción de UV del retenido a 280 nm, con una proteína modelo bajo condiciones normales. Como puede apreciarse, el tiempo de residencia medio del producto en el sistema es solo aproximadamente 40 minutos. Por tanto, el tiempo de residencia total del producto en esta presente realización del dispositivo A, desde la línea de cosecha del fermentador hasta el retenido concentrado final (aislado), se mantiene en el plazo de 1-2 horas o menos. Esto es menos de 1/10 del tiempo de residencia de 28 horas o más en un proceso de aislamiento discontinuo convencional, en el que el producto (cosecha) se recoge durante al menos 24 horas (a varios días), después de que el producto se procese durante normalmente al menos 4-10 horas.

20 La Figura 11 muestra una comparación de los rendimientos de aislamiento total resultantes del factor de coagulación de la sangre recombinante (rFVIII) de fermentación por perfusión continua libre de proteína del plasma para tanto un proceso de aislamiento discontinuo convencional (filtración discontinua más UF discontinua) como usando el dispositivo inventivo A y método respectivo. Como puede apreciarse de la figura, el proceso continuo inventivo logra significativamente mayor rendimiento de producto, que puede conducir a capacidades de fabricación elevadas y costes de fabricación reducidos.

25 Durante el método de uso inventivo del dispositivo A, la presión transmembrana de la ultrafiltración continua integrada va a aumentar con el tiempo, mientras que el flujo de membrana específico (en litros/hora/m²/bar) está disminuyendo a caudal volumétrico constante. Esto es común a todos los procesos de ultrafiltración y es debido a efectos como la polarización por concentración, formación de capa de gel e incrustación. Sin embargo, a diferencia de la ultrafiltración discontinua, como puede apreciarse del ejemplo mostrado en la Figura 12, los cambios de presión y flujo específico son extremadamente bajos con el dispositivo A, permitiendo la operación continua durante semanas enteras, antes de que las membranas necesiten ser limpiadas o sustituidas. Adicionalmente, la tasa de cambio y el rendimiento global del sistema es bastante insensible al producto producido o la línea celular usada en la fermentación por perfusión continua (Figura 12). Por tanto, el dispositivo inventivo A y el método respectivo también son idealmente adecuados como plataforma genérica para la rápida producción de diversas proteínas, ya que se lleva a cabo de forma robusta y predictiblemente con diversas proteínas diana de diferentes líneas celulares.

30 Sorprendentemente, los solicitantes descubrieron que los efectos negativos de la formación de capa de gel e incrustación se minimizan de hecho mucho con el dispositivo A, que puede procesar un volumen total mucho mayor por área de ultrafiltro instalada, antes de que sea necesaria la limpieza o sustitución de filtros. La Figura 13 muestra el robusto rendimiento del dispositivo inventivo A en una ejecución a largo plazo. Después de aproximadamente 25 días pareció sorprendentemente que la presión transmembrana se estabilizaba en un estado quasi-estacionario, sugiriendo incluso mayor rendimiento a largo plazo. En el día 27, la velocidad de flujo del retenido se duplicó intencionadamente para probar el efecto de mayor caudal. Después de 34 días, se realizó un lavado corto con NaOH estéril 0,5 M, sin abrir el sistema, y así mientras que se mantenía la integridad y esterilidad del sistema completo. Después de esto, la TMP se estabilizó de nuevo, o al menos aumentó solo a una velocidad extremadamente baja. Después de 70 días de operación estéril continua, la velocidad de flujo de recirculación se redujo intencionadamente a la mitad para probar el efecto sobre el rendimiento del sistema. Como era de esperar, la TMP empezó a aumentar con una velocidad algo mayor debido a la reducida transferencia de masa y así aumentó la concentración de pared en la superficie de la membrana. Sin embargo, se completaron satisfactoriamente y robustamente 95 días de operación antes de que el sistema se apagara. Se han procesado un total de cerca de 4500 litros por m² de área de membrana, con trabajo manual mínimo (muestreo diario solo). En comparación, el proceso de ultrafiltración discontinua convencional optimizado para la misma aplicación tiene 45 veces menos capacidad de carga, a aprox. 100 l/m², y requiere al menos 1-2 operarios a tiempo completo.

35 También sorprendentemente, la selectividad del dispositivo inventivo A, en particular su sistema de ultrafiltración continua integrada (300), demostró ser significativamente mayor que la selectividad de un proceso discontinuo convencional. Es muy conocido para aquellos familiarizados con el campo que en la ultrafiltración discontinua convencional se forma una membrana secundaria de macromoléculas retenidas durante la etapa inicial del proceso (capa de gel), que reduce el corte de peso molecular aparente. El resultado es que se retienen tanto la molécula diana como proteínas más pequeñas contaminantes, que hace prácticamente imposible la significativa purificación simultánea. Por tanto, con ultrafiltración discontinua convencional es raramente posible separar proteínas que están separadas menos de un factor de 10 en términos de su peso molecular. Sin embargo, como puede apreciarse de la Figura 14, con el proceso de ultrafiltración continua integrada inventivo es posible ajustar condiciones para separar

eficazmente IL-2SA (aprox. 16 kD) y proteína verde fluorescente GFP (27-30 kD). Este rendimiento de separación superior al esperado permite concentración y purificación simultáneas.

Beneficios del dispositivo B y método respectivo

5 La Figura 15 ilustra el rendimiento del dispositivo inventivo B. Usando un adsorbente convectivo comercial (Mustang Q, Pall Corporation, módulo de 15 capas) se han realizado cerca de 100 ciclos de adsorción/desorción consecutivos, concentrando y purificando así una variante de FVIII recombinante de cultivo de perfusión continua. El rendimiento promedio logrado fue de aproximadamente el 95 % (resulta dispersión de la variación del ensayo), mientras que la presión se mantuvo relativamente constante durante el número de ciclos entero realizado. Por tanto, puede especificarse que pueden realizarse al menos 100 ciclos consecutivos antes de intercambiar la configuración de adsorbente.

15 Como se ha mostrado en la descripción en detalle del método de uso del dispositivo inventivo B, el tiempo de residencia medio total del producto en una presente realización es inferior a 3 horas, antes de eluirse en forma concentrada, purificada y estabilizada en un tampón apropiado. Esto es significativamente menos que el tiempo de residencia de más de 24 horas en un proceso de aislamiento discontinuo convencional realizado una vez al día y, por tanto, produce rendimiento significativamente mayor de los productos de proteína inherentemente lábiles. En una presente realización descrita antes, se realizan aproximadamente 13 ciclos por día, que significa en el contexto de la Figura 15 que el ensamblaje de adsorbente semi-continuo necesitaría intercambiarse solo cada 7-8 días, que se hace sin comprometer la esterilidad y continuidad de la operación.

25 La Figura 16 muestra un ejemplo del perfil de UV y de conductividad durante un único ciclo de adsorción/desorción y de regeneración típico con el dispositivo B. Puede observarse que pueden cargarse más de 450 volúmenes de adsorbente (CV), mientras que el producto eluye en un pico muy afilado. Los contaminantes se eliminan significativamente en el flujo a través durante la fase de carga, además de durante el lavado y el arrastre (fase de regeneración).

30 La Figura 17 ilustra el rendimiento de purificación del proceso inventivo que comprende adsorción/desorción convectiva semi-continua. Se muestra un gel de SDS-PAGE de ejemplo de un aislado de variante de FVIII. Como puede apreciarse, las fracciones de eluato, que incluyen 95 % de la variante de FVIII cargada (como se determina por ensayo de actividad separado), contienen significativamente menos proteína que la carga y así se purifican. No son visibles bandas de degradación adicionales en el eluato (aislado), que indica excelente calidad del producto.

35 En resumen, el dispositivo inventivo B es capaz de lograr rendimiento de purificación similar como procesos discontinuos comparables, mientras que se minimizan al mismo tiempo las pérdidas de rendimiento para productos de proteína inherentemente inestables, además de problemas de la calidad del producto, debido a la minimización del tiempo de residencia del producto. Al mismo tiempo, los costes de laboratorio se reducen espectacularmente debido al grado de automatización inherentemente alto del proceso inventivo, que requiere mínima intervención del operario.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso de purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea, que comprende:
- (a) producir por un proceso de fermentación por perfusión continua una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea que contiene una proteína de interés;
 - (b) transferir la mezcla de fluido de cultivo de tejido a un proceso de eliminación de partículas continuo integrado con el proceso de fermentación por perfusión continua;
 - 10 (c) eliminar contaminantes en partículas del fluido de cultivo de tejido en el proceso de eliminación de partículas continuo para producir un fluido de cultivo de tejido clarificado que contiene la proteína de interés;
 - (d) transferir el fluido de cultivo de tejido clarificado a un proceso de purificación continuo integrado con el proceso de eliminación de partículas continuo, en el que el proceso de purificación continuo es ultrafiltración y el fluido de cultivo de tejido clarificado se filtra a una velocidad de flujo específica que produce una concentración de pared inferior al 20 % superior a una concentración de retenido; y
 - 15 (e) purificar la proteína de interés del fluido de cultivo de tejido clarificado en el proceso de purificación continuo;
- en el que la velocidad de flujo específica de la mezcla a través del proceso de fermentación por perfusión continua, el proceso de eliminación de partículas continuo y el proceso de purificación continuo se mantiene sustancialmente constante.
- 20
2. El proceso según la reivindicación 1, en el que la mezcla de cultivo de tejido clarificada se filtra a una velocidad de flujo específica de manera que se produce una concentración de pared inferior al 15 % superior a la concentración de retenido.
- 25
3. El proceso según la reivindicación 1, en el que la mezcla de cultivo de tejido clarificada se filtra a una velocidad de flujo específica de manera que se produce una concentración de pared inferior al 10 % superior a la concentración de retenido.
- 30
4. El proceso según la reivindicación 1, en el que la mezcla de cultivo de tejido clarificada se filtra a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados entre 0,1 y 2 veces la velocidad de flujo volumétrica de la fermentación por perfusión continua en litros/hora.
- 35
5. El proceso según la reivindicación 1, en el que la mezcla de cultivo de tejido clarificada se filtra a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados entre 0,3 y 1 veces la velocidad de flujo volumétrica de la fermentación por perfusión continua en litros/hora.
- 40
6. Un aparato para separar una proteína de interés de una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea, que comprende:
- (a) un sistema de fermentación por perfusión continua;
 - (b) un sistema de eliminación de partículas continuo integrado con el sistema de fermentación por perfusión; y
 - (c) un sistema de purificación continuo que es ultrafiltración integrada con el sistema de eliminación de partículas;
- 45 en el que el aparato se mantiene bajo condiciones estériles.
7. El aparato según la reivindicación 6, que comprende:
- (a) un sistema de fermentación por perfusión continua adaptado para producir continuamente un fluido de cultivo de tejido que contiene una proteína de interés a una velocidad de flujo volumétrica sustancialmente constante;
 - (b) un sistema de eliminación de partículas continuo integrado con y adaptado para recibir continuamente el fluido de cultivo de tejido del sistema de fermentación por perfusión y producir continuamente un fluido de cultivo de tejido clarificado; y
 - 55 (c) un sistema de purificación continuo que es ultrafiltración integrada con y adaptada para recibir continuamente el fluido de cultivo de tejido clarificado del sistema de eliminación de partículas y producir continuamente un aislado de producto que contiene la proteína de interés;
- en el que el aparato se mantiene bajo condiciones estériles.
- 60
8. El aparato de la reivindicación 7, en el que el sistema de ultrafiltración comprende una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados entre 0,1 y 2 veces la velocidad de flujo volumétrica de la fermentación por perfusión continua en litros/hora.
- 65
9. El aparato de la reivindicación 7, en el que el sistema de ultrafiltración comprende una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados entre 0,3 y 1 veces la velocidad de flujo volumétrica de la fermentación por perfusión continua en litros/hora.

Figura 1: Esquema del proceso de perfusión continua convencional seguido de 3 etapas de proceso de aislamiento físicamente y logísticamente separadas (recogida de la cosecha por lotes, eliminación de partículas del lote y concentración/purificación del lote)

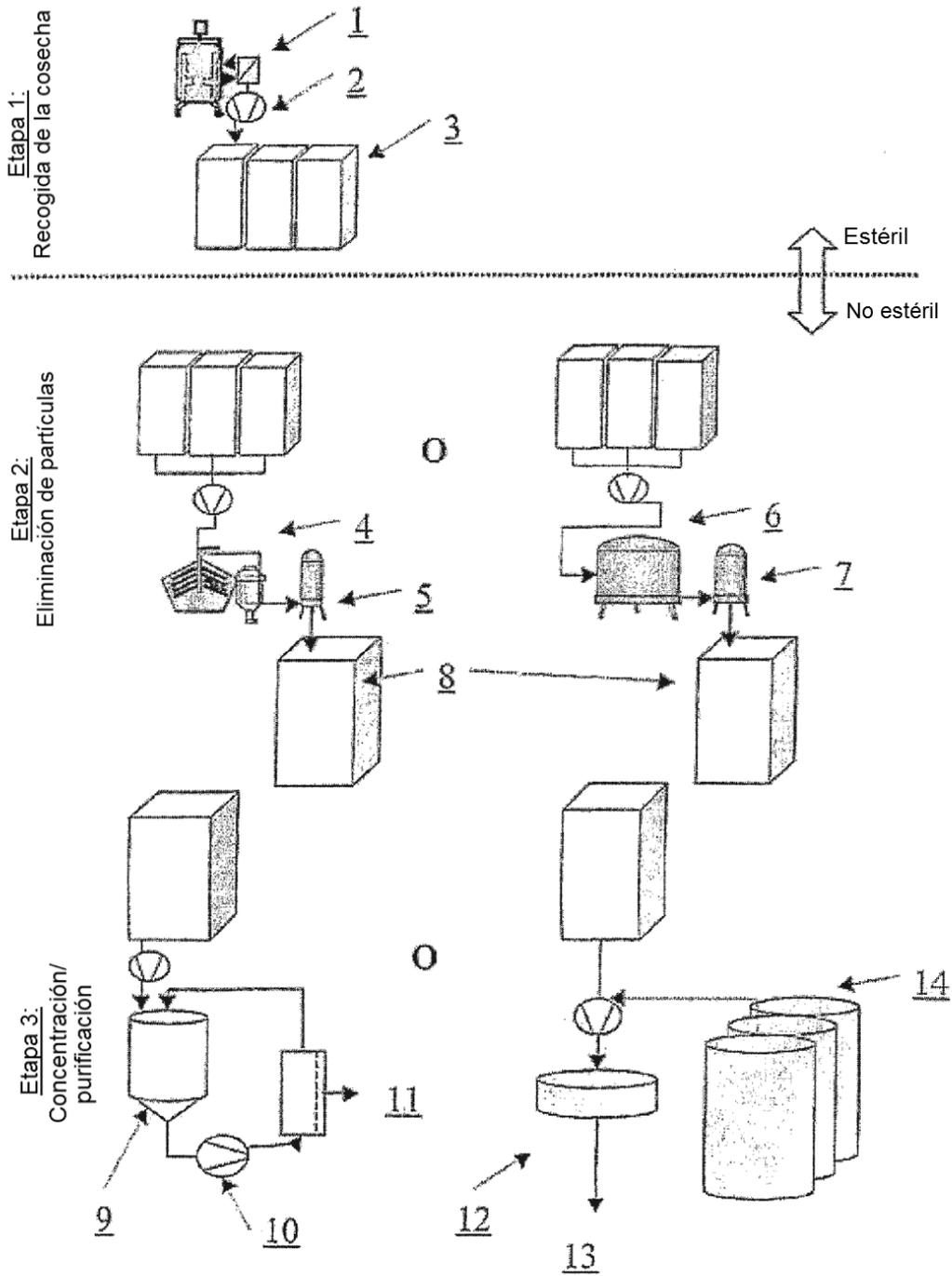


Figura 2: Representación esquemática de 2 realizaciones del dispositivo inventivo A para la fabricación continua, integrada y estéril. Esquema de realización A1 mostrado a la izquierda y esquema de realización A2 mostrado a la derecha.

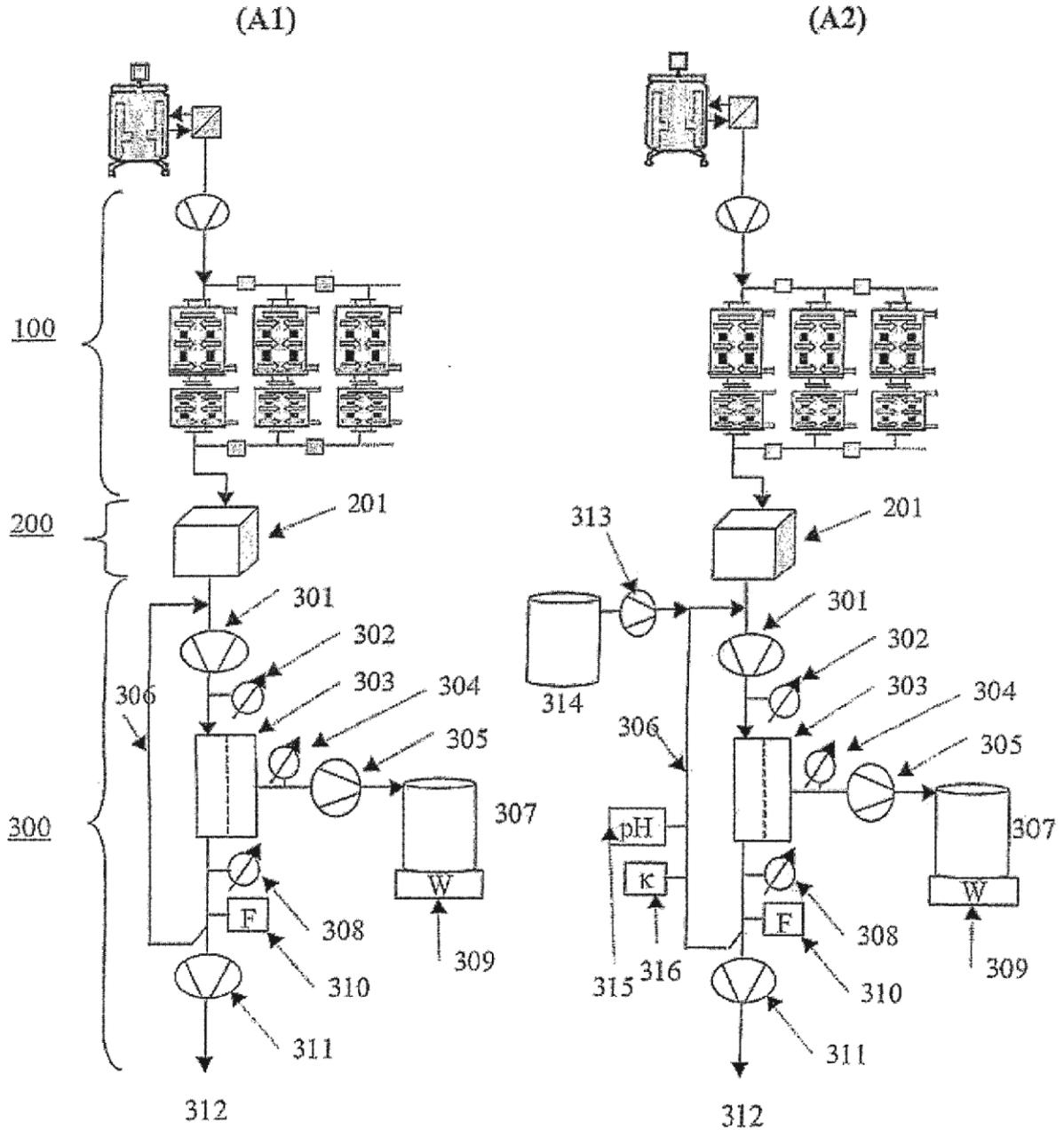


Figura 3: Representación esquemática de 2 realizaciones del dispositivo inventivo B para la fabricación continua, integrada y estéril. Esquema de realización B1 mostrado a la izquierda y esquema de realización B2 mostrado a la derecha.

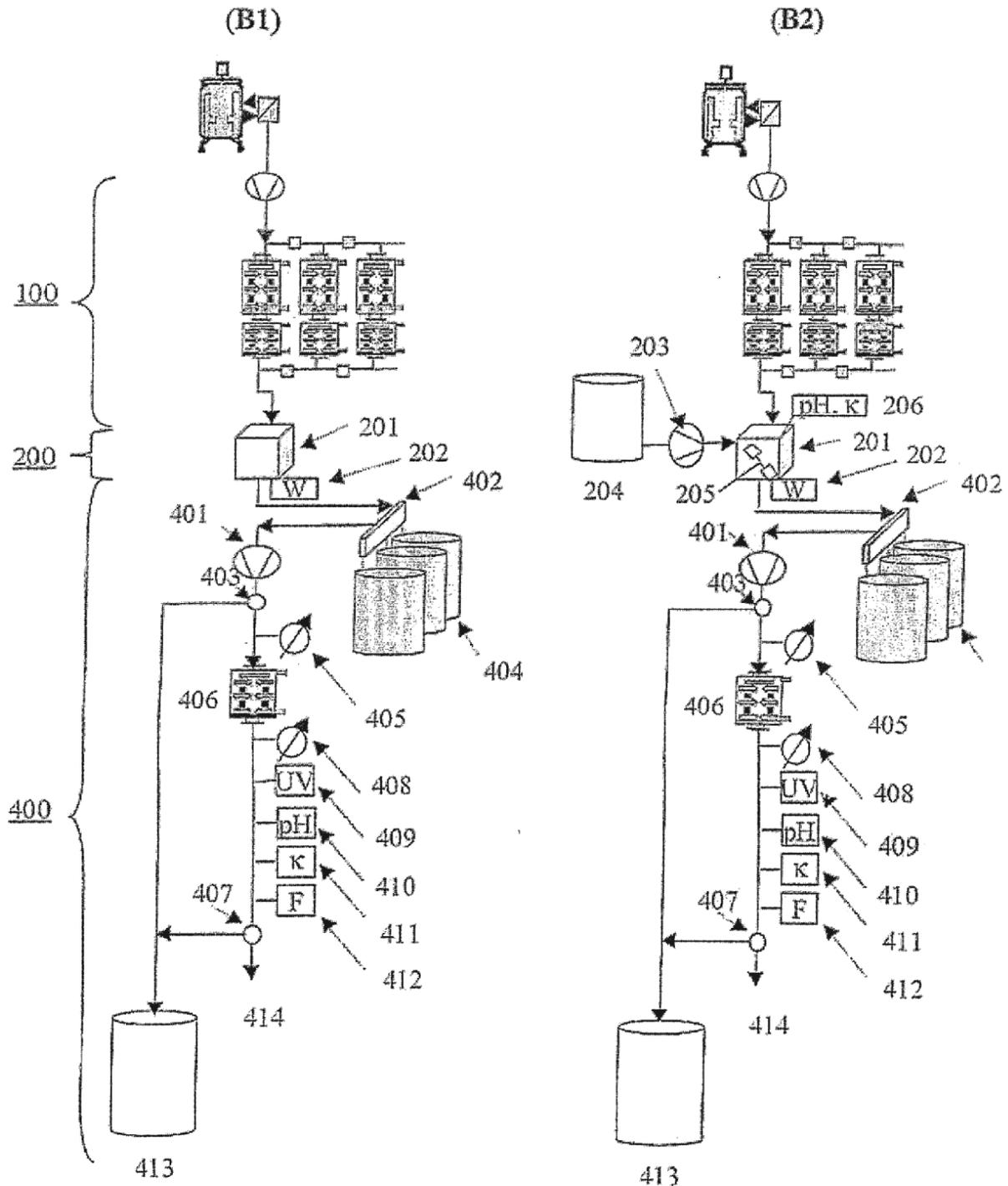


Figura 4: Esquema de una realización del sistema de eliminación de partículas continuo integrado inventivo (100), un elemento de tanto el dispositivo inventivo A como el dispositivo inventivo B.

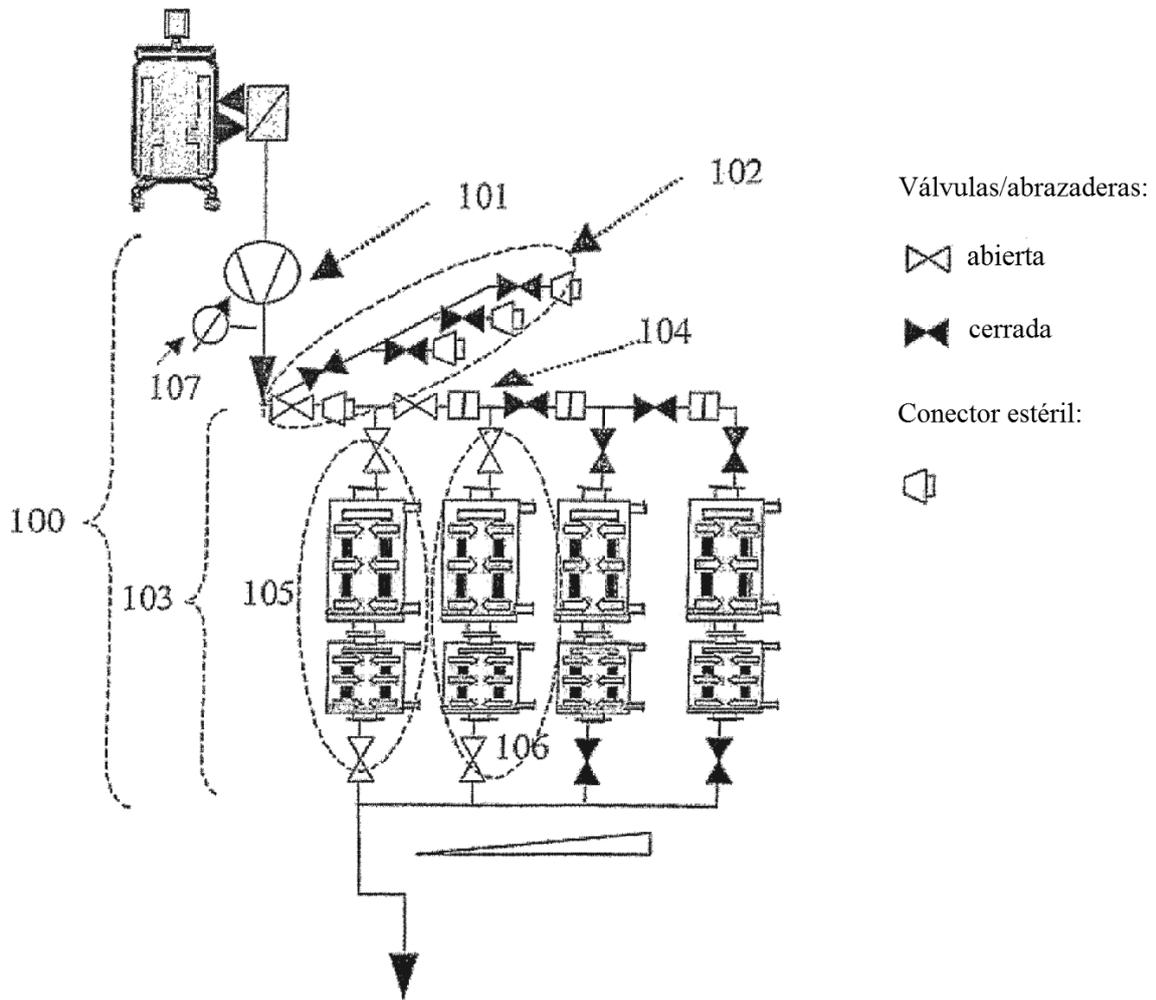


Figura 5: Representaciones esquemáticas de realizaciones adicionales del dispositivo inventivo A que combinan múltiples elementos para tanto aumentar la capacidad de la planta global (A3) como el rendimiento de concentración y separación (A4).

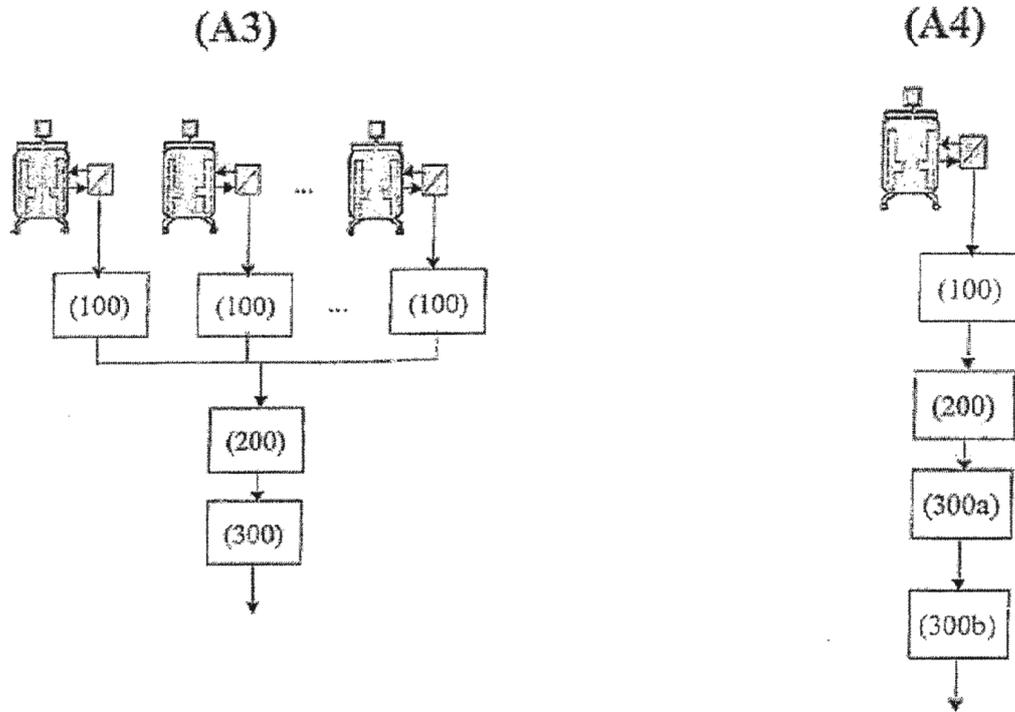


Figura 6: Representaciones esquemáticas de realizaciones adicionales del dispositivo inventivo B.

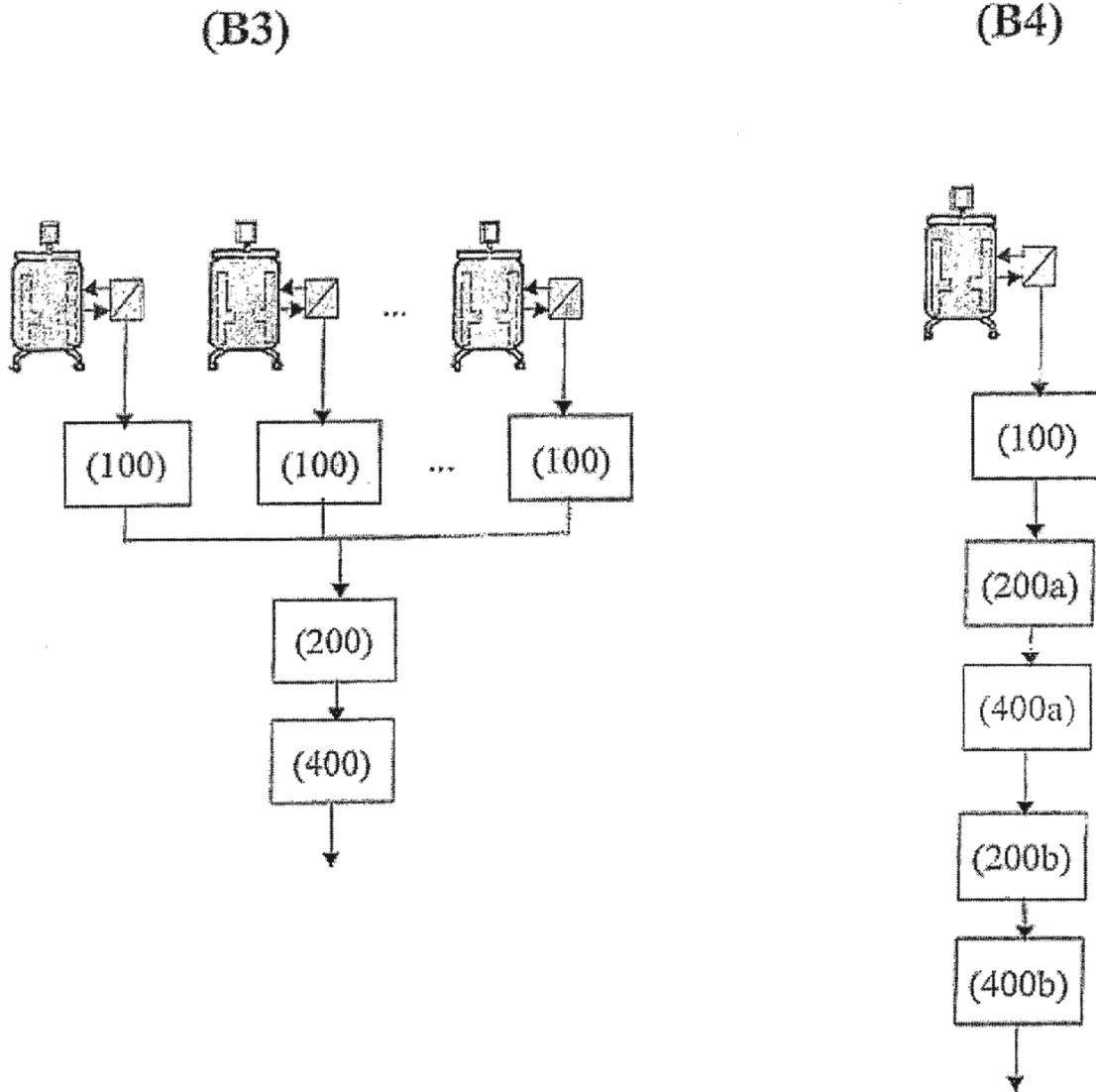


Figura 7: Realización adicional de dispositivos inventivos que combina los elementos del dispositivo A y dispositivo B en serie para aumentar en rendimiento de concentración y separación global.

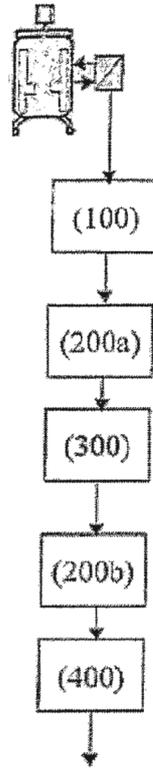
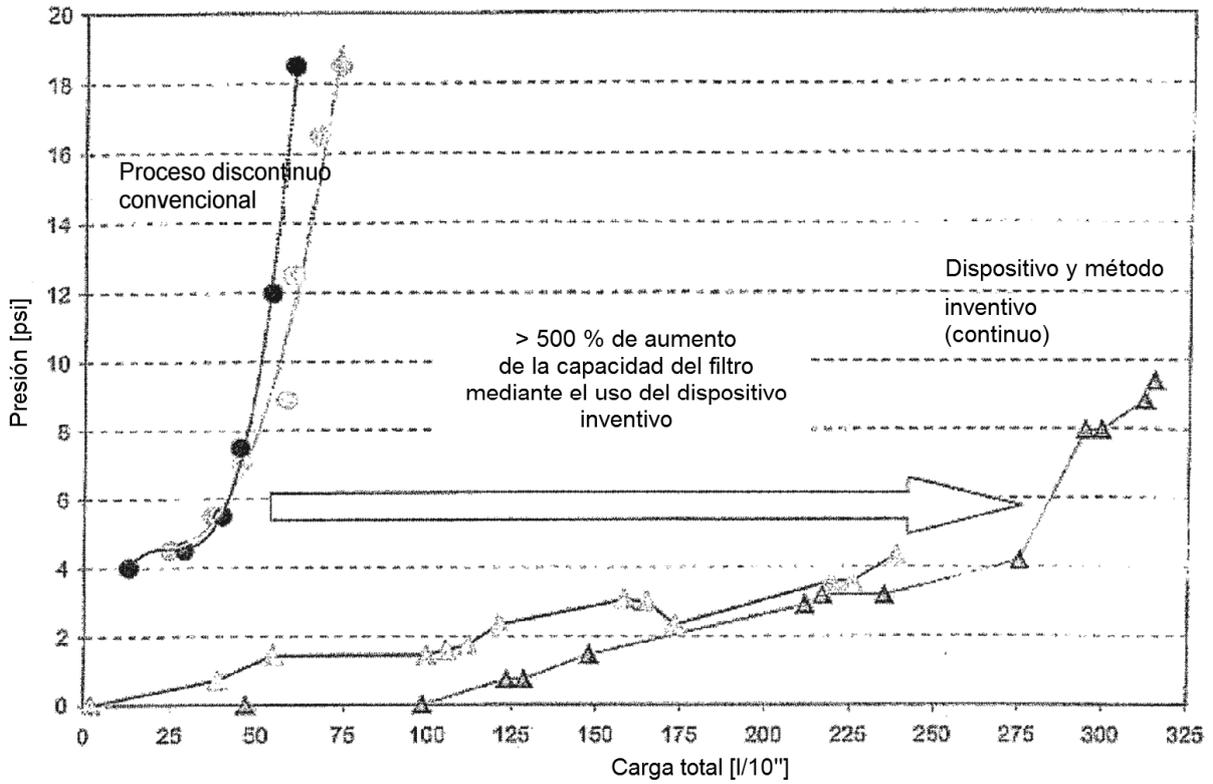


Figura 8: Comparación de ejemplo de las capacidades de carga total por 10" de cápsula de filtro para el proceso discontinuo convencional y realización del dispositivo inventivo y método para la eliminación de partículas continua (proceso de filtración continuo integrado) usando cápsulas de filtro comerciales idénticas. Se muestra método de ejemplo de producción de factor de coagulación de la sangre VIII recombinante.



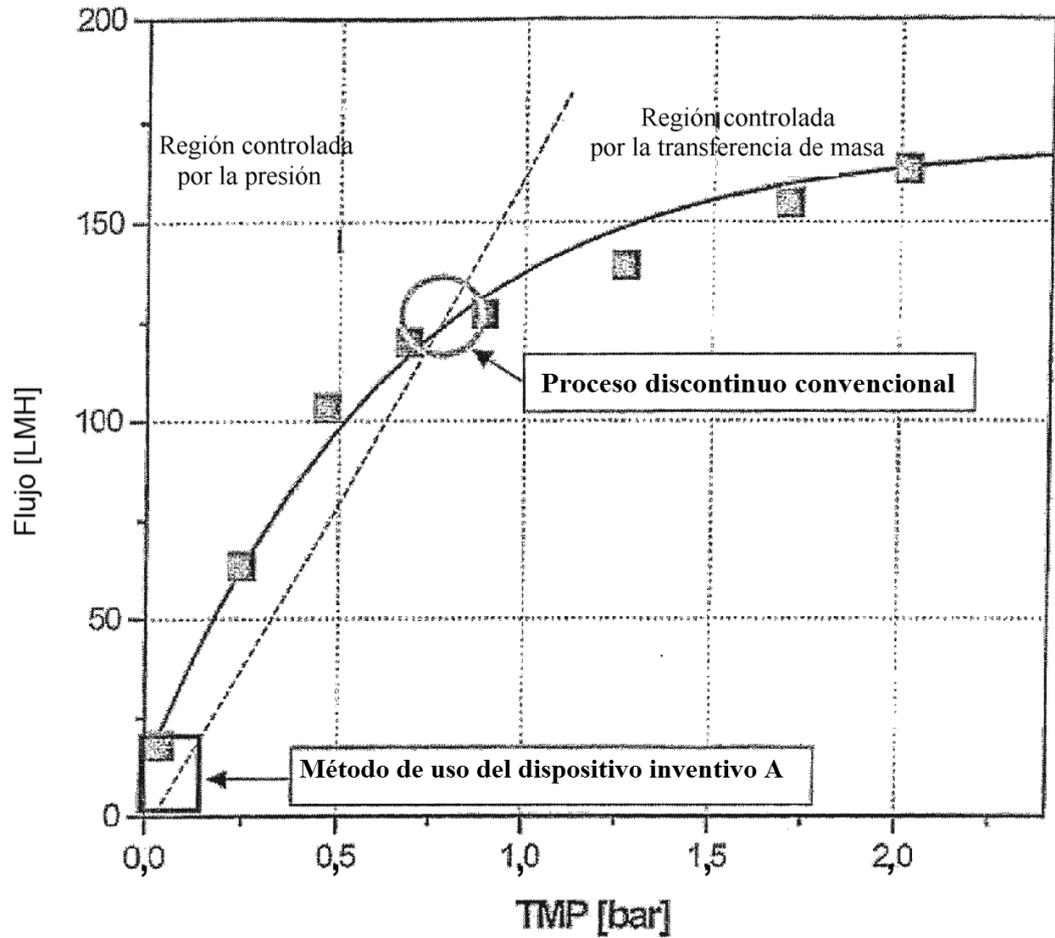


Figura 9: Ejemplo de curva de presión-flujo (flujo de permeado específico en LMH = litros/hora/m² por encima de la presión transmembrana) y determinación del punto de operación. El círculo muestra el punto de operación típico que se ajustará mediante la TMP para procesos discontinuos convencionales. El rectángulo muestra la región operacional preferida que se ajustará mediante la bomba de permeado según el método de uso del dispositivo inventivo A.

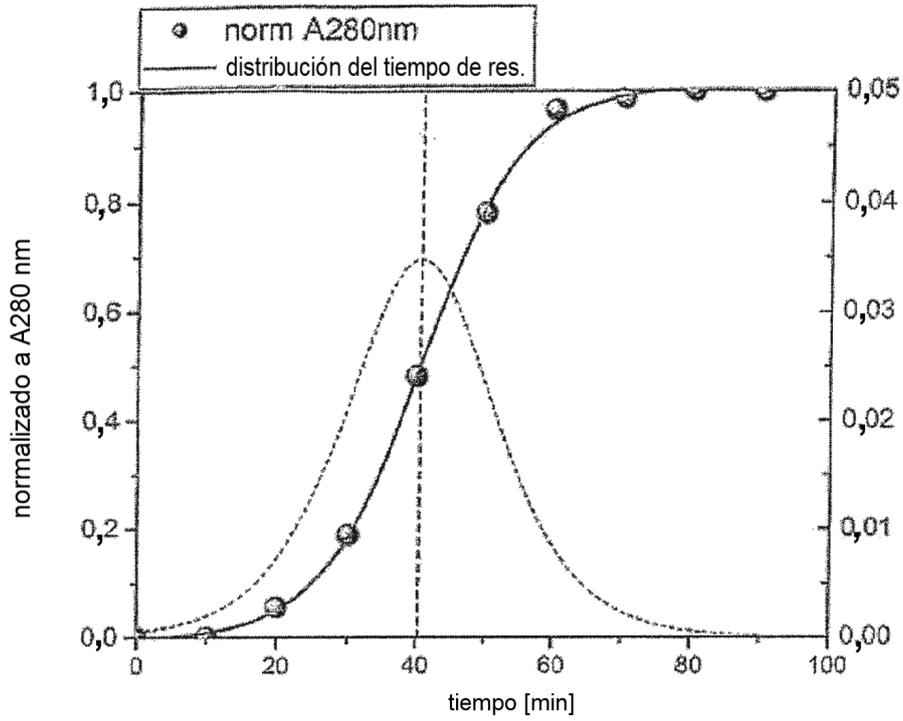


Figura 10: Ejemplo de la distribución del tiempo de residencia y tiempo de residencia medio del sistema de UF continuo integrado (300) según el método de uso del dispositivo inventivo A. Medido para el sistema continuo desechable con módulo de 290 cm² (62,5 cm de longitud), 120 LMH de flujo cruzado, 0,2 LMH de flujo de retenido, 2 LMH de flujo de permeado.

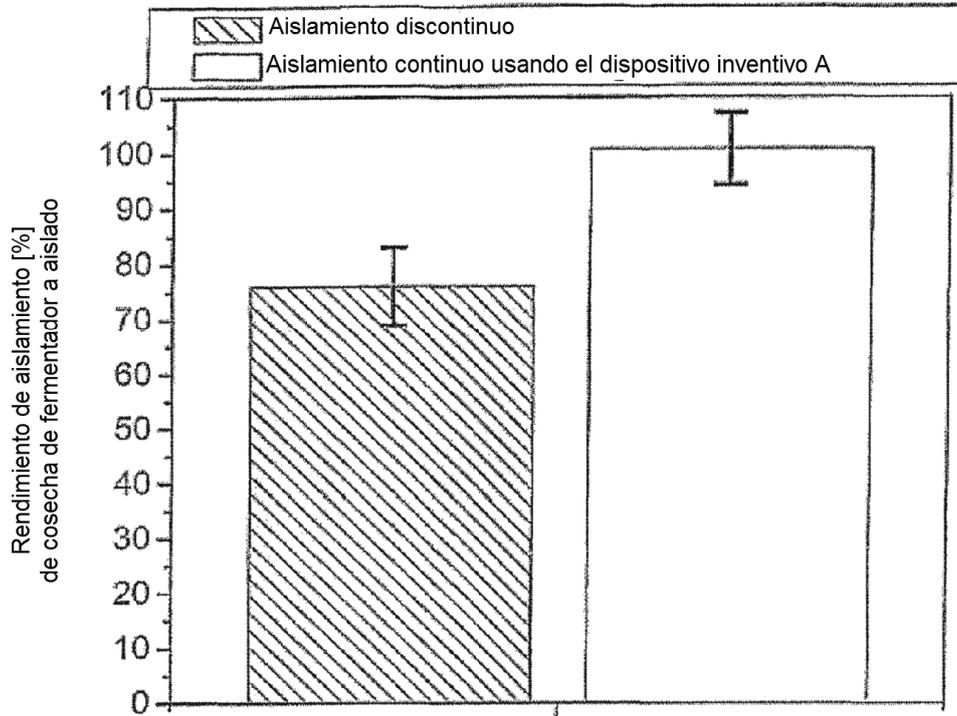


Figura 11: Ejemplo de aislamiento de rFVIII de fermentación por perfusión continua libre de proteínas del plasma usando una realización del dispositivo inventivo A. Comparación del rendimiento de aislamiento promedio del método continuo inventivo en comparación con el rendimiento promedio de aislamiento discontinuo, que incluye una propagación de la desviación estándar. Se usaron 3 lotes consecutivos para determinar el rendimiento discontinuo, mientras que se usaron 3 puntos consecutivos (días) para el proceso continuo.

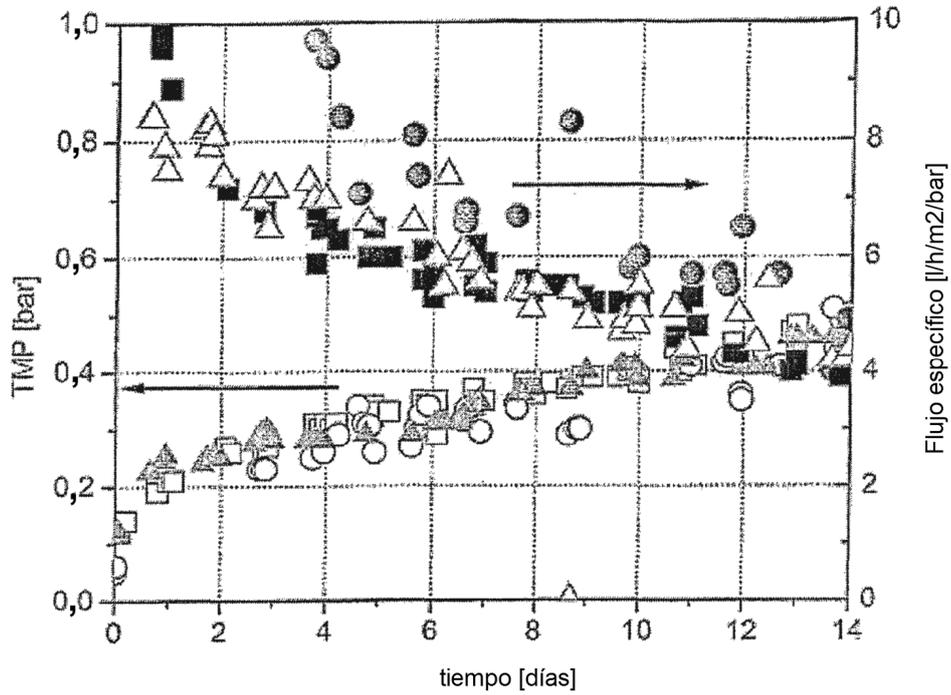


Figura 12: Ejemplos de rendimiento del dispositivo inventivo A. Presión transmembrana y flujo específico del sistema de ultrafiltración continua integrada (300) en función del tiempo del proceso continuo para 3 ejemplos diferentes mostrados. Triángulos = membrana de 100 kD, factor de coagulación de la sangre VIII recombinante (rFVIII); Cuadrados = membrana de 10 kD, interleucina-2 recombinante; Círculos = membrana de 50 kD, glucoproteína genéticamente manipulada (Mr > 100 kD). Todos los ejemplos mostrados son de fermentación por perfusión continua libre de proteínas del plasma.

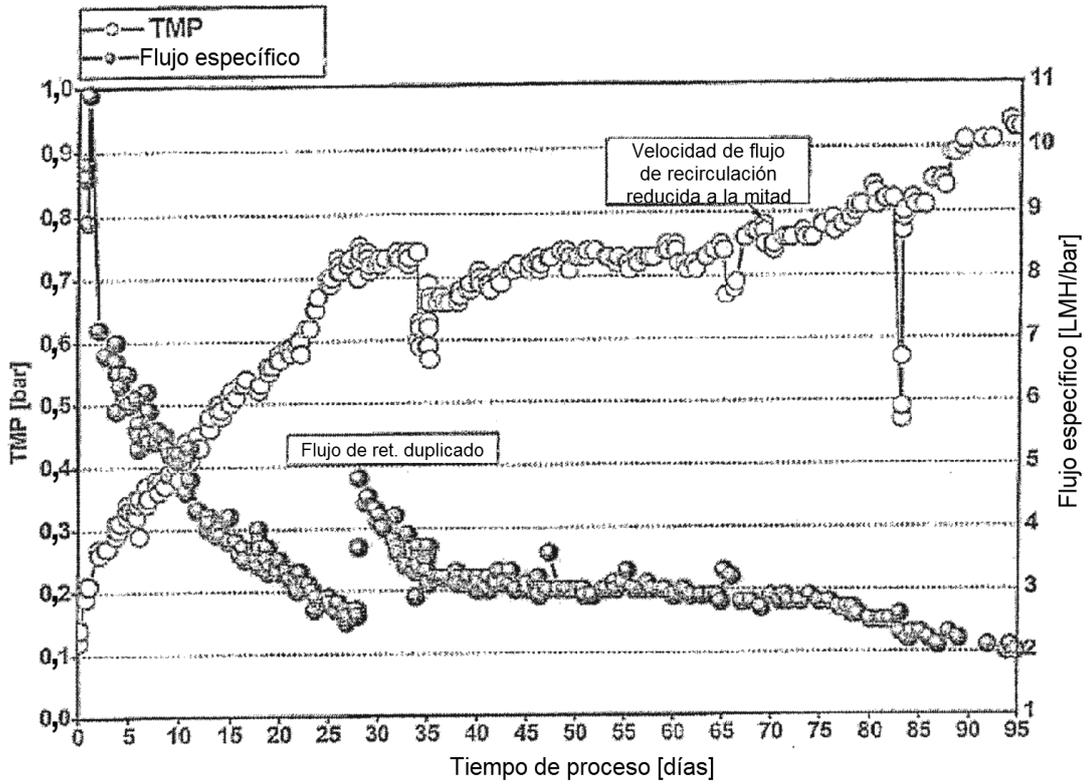


Figura 13: Ejemplo de rendimiento a largo plazo del dispositivo inventivo A directamente acoplado a la fermentación por perfusión continua de línea celular que co-expresa 2 productos de proteína (proteína verde fluorescente GFP e IL-2SA). Se muestra la presión transmembrana y el flujo específico del sistema de ultrafiltración continua (300) inventivo en función del tiempo de proceso continuo. Se usó membrana de 10 kD.

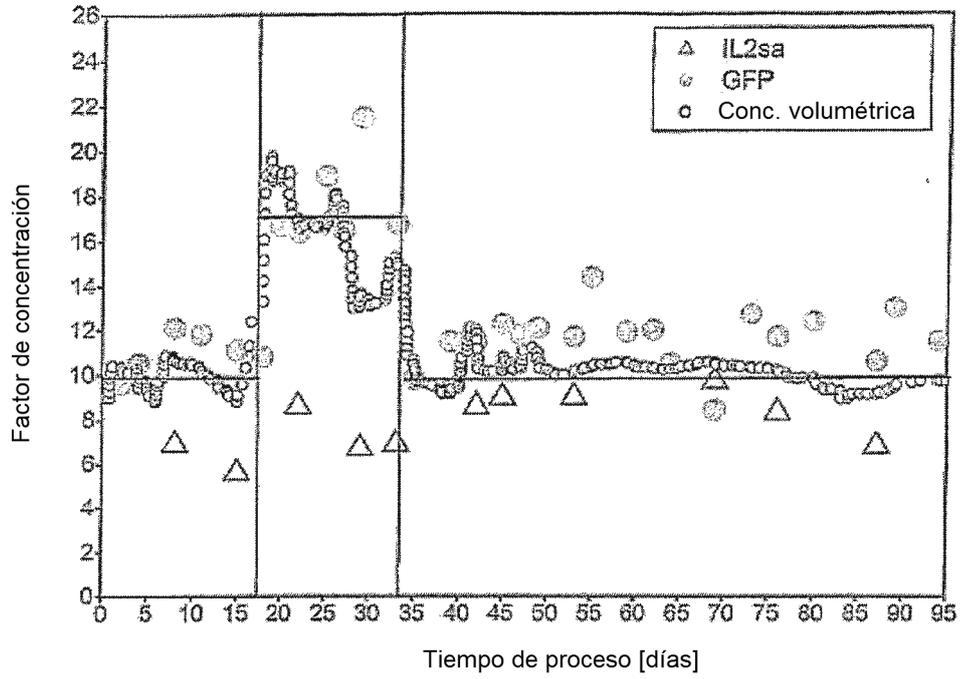


Figura 14: Ejemplo de rendimiento a largo plazo del dispositivo inventivo A directamente acoplado a la fermentación por perfusión continua de línea celular que co-expresa 2 productos de proteína (proteína verde fluorescente GFP e IL-2SA). Se usó membrana de 10 kD. Factor de concentración de ambos productos de proteína, como se ha determinado por ensayos específicos, y factor de concentración volumétrico mostrados en función del tiempo de proceso continuo.

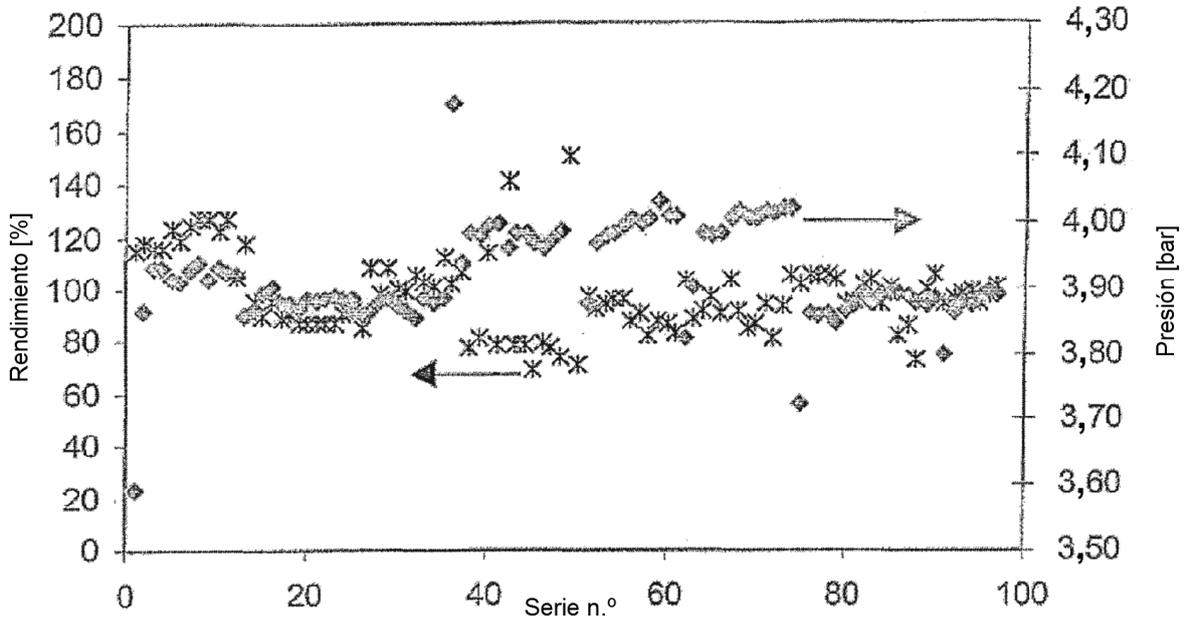


Figura 15: Ejemplo de rendimiento del dispositivo inventivo B. Rendimiento y caída de presión con respecto a cerca de 100 ciclos de adsorción/desorción consecutivos con adsorbente convectivo (proteína diana: variante del factor de coagulación de la sangre FVIII genéticamente manipulada; adsorbente convectivo: adsorbente comercial, Mustang Q, Pall Corporation).

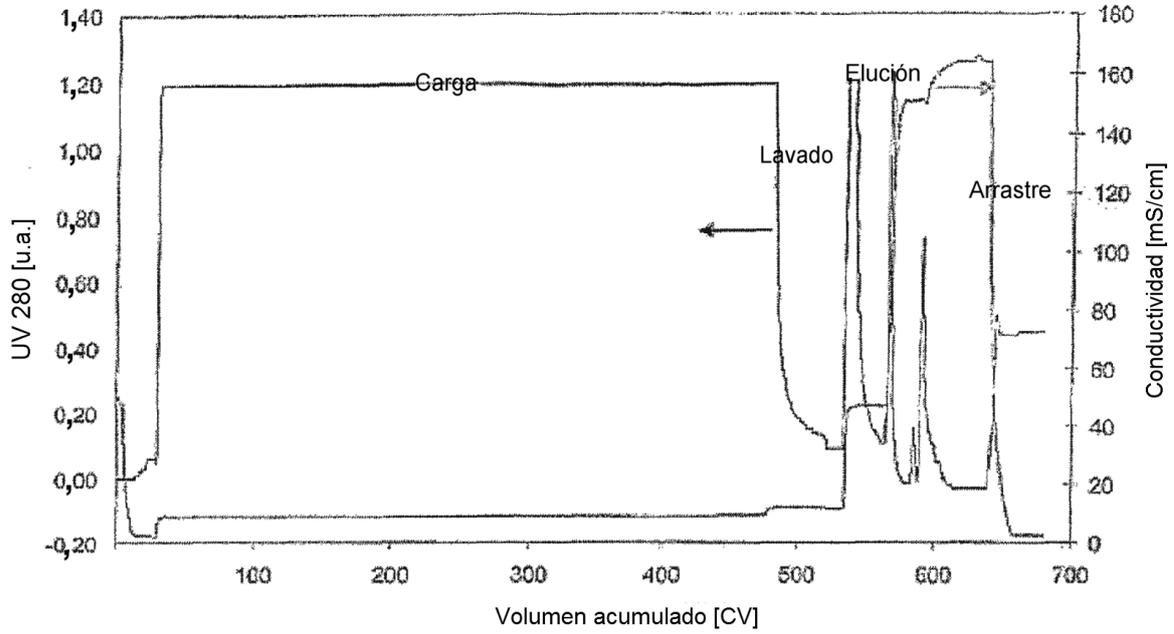


Figura 16: Ejemplo de rendimiento del dispositivo inventivo B. Perfil de UV y de conductividad durante un ciclo de adsorción/desorción típico con adsorbente convectivo (proteína diana: variante del factor de coagulación de la sangre FVIII genéticamente manipulada; adsorbente convectivo: adsorbente comercial, Mustang Q, Pall Corporation).

Figura 17: Ejemplo de rendimiento del dispositivo inventivo B. Se muestran gel de SDS-PAGE (teñido con plata) de carga = cosecha clarificada que abandona continuamente el sistema de eliminación de partículas (100) y cargada semi-continuamente sobre el sistema de adsorbente convectivo (400) y eluato de adsorción/desorción típico. Proteína diana: variante del factor de coagulación de la sangre FVIII genéticamente manipulada; adsorbente convectivo: adsorbente comercial, Mustang Q, Pall Corporation). El eluato se diluyó de nuevo a la concentración de carga antes de ejecutar sobre el gel.

