

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 092**

51 Int. Cl.:

**A23J 1/00** (2006.01)

**B01D 39/00** (2006.01)

**B01D 61/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2006 PCT/US2006/008215**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2007 WO07106078**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2006 E 06737391 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 1991063**

54 Título: **Clarificación de leche transgénica mediante el uso de filtración en profundidad.**

30 Prioridad:

**16.02.2006 US 355557**

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

**09.06.2017**

73 Titular/es:

**LFB USA, INC. (100.0%)  
175 Crossing Boulevard  
Framingham, MA 01702, US**

72 Inventor/es:

**PERRAULT, MARK**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 616 092 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**

Clarificación de leche transgénica mediante el uso de filtración en profundidad.

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona un método y sistema mejorados para purificar moléculas objetivo específicas de contaminantes que se encuentran en una corriente de alimentación inicial. De forma más específica, los métodos de la presente invención proporcionan el procesamiento de una disolución de muestra a través de un método de filtración en profundidad mejorado que mejora la purificación, clarificación y fraccionamiento de una molécula deseada a partir de un material fuente dado.

Antecedentes de la invención

10 La presente invención se refiere a métodos y aparatos mejorados para la producción de proteínas de interés a partir de un material fuente dado. Cabe señalar que la producción de grandes cantidades de moléculas biológicamente activas, relativamente puras es importante a nivel económico para la fabricación de formulaciones farmacéuticas, proteínas, enzimas, anticuerpos y otros compuestos especializados de humanos y animales. Diversas técnicas de ADN recombinante se han convertido en el método elegido para la producción de muchos polipéptidos, anticuerpos  
15 y proteínas, dado que estos métodos permiten una producción a gran escala de dichas proteínas. Las diversas «plataformas» que se pueden utilizar para dicha producción incluyen cultivos celulares de bacterias, levaduras, insectos o mamíferos, así como plantas o animales transgénicos. En los sistemas con animales transgénicos, el tipo de animal preferido es la producción en mamíferos productores de leche, pero la tecnología de plataforma para transgénicos también contempla la utilización de animales avícolas u otros animales para producir proteínas,  
20 anticuerpos exógenos o fragmentos o fusiones de los mismos.

25 La producción de proteínas recombinantes implica la transfección en células hospedadoras de ADN que codifica para la proteína de interés y el cultivo de las células hospedadoras, animales o plantas transgénicos en condiciones que favorecen la expresión de la proteína recombinante u otra molécula de interés. El sistema *procarionte - E. coli* ha sido un sistema hospedador de cultivo celular favorito porque se puede crear para producir proteínas recombinantes con altos rendimientos. Sin embargo, las *E. coli* a menudo son incapaces de producir moléculas complejas o grandes con un plegado terciario adecuado y resultan en actividad biológica reducida o aberrante.

30 Con la mejora en la producción de proteínas exógenas u otras moléculas de interés a partir de sistemas biológicos, ha aumentado la presión sobre la industria de la biotecnología para el desarrollo de nuevas técnicas para mejorar el volumen de producción y que estas sean simultáneamente más eficaces y rentables en materia de purificación y recuperación de producto. Es decir, con los nuevos productos y volúmenes mayores de productos conocidos, existe un interés sustancial en concebir métodos para llevar estos productos terapéuticos al mercado en volúmenes comerciales de forma rápida. Al mismo tiempo, la industria se enfrenta a nuevos desafíos en relación con el desarrollo de nuevos procesos para la recuperación de proteínas y anticuerpos transgénicos a partir de diversos fluidos corporales que incluyen la leche, sangre y orina.

35 Las tecnologías de filtración han sido herramientas fundamentales en el procesamiento de alimentos durante más de 25 años. La industria de la preparación de alimentos representa una parte importante de la industria de la filtración y clarificación a nivel mundial. Las principales aplicaciones de los procesos de filtración están en la industria lechera (concentración de proteína de lactosuero, estandarización de proteínas de la leche, etc.), de bebidas (vino, cerveza, jugos de frutas, etc.) y ovoproductos. Entre las numerosas aplicaciones de la presente invención a escala industrial,  
40 la clarificación de jugos de frutas, verduras y azúcar mediante microfiltración también posibilita simplificar la dinámica de fluidos y mejorar la calidad del producto final.

45 Con la producción a gran escala típicamente existen problemas más complejos. Además, existen desafíos adicionales que se imponen en relación con alcanzar la pureza y seguridad del producto, principalmente en materia de seguridad viral y contaminantes residuales, tales como ADN y proteínas de célula hospedadora que podrían ser exigidos por diversas agencias gubernamentales que supervisan la producción de productos farmacéuticos útiles de forma biológica.

50 En la actualidad existen diversos métodos disponibles para separar moléculas de interés biológico tales como proteínas, a partir de mezclas de las mismas. Una de dichas técnicas importante es la cromatografía de afinidad, que separa moléculas en función de la unión específica y selectiva de moléculas deseadas con una matriz o gel de afinidad, mientras la molécula indeseable permanece sin unirse y se puede extraer del sistema. Los geles de afinidad típicamente consisten en un resto de unión a un ligando inmovilizado en un soporte de gel. Por ejemplo, GB 2.178.742 utiliza un método de cromatografía de afinidad para purificar hemoglobina y sus derivados modificados de forma química en función del hecho de que la hemoglobina natural se une específicamente a una familia específica de restos polianiónicos. Para la captura, estos restos se inmovilizan en el propio gel. En este proceso, la hemoglobina no modificada se retiene en el gel de afinidad, mientras que la hemoglobina modificada, que no puede unirse al gel debido a que su sitio de unión al polianión está ocupado de forma covalente por el agente de  
55

modificación, se extrae del sistema. Las columnas de cromatografía de afinidad son altamente específicas y, por consiguiente, proporcionan productos muy puros; sin embargo, la cromatografía de afinidad es un proceso relativamente costoso y, por lo tanto, muy difícil de llevar a cabo para operaciones comerciales.

5 En la industria de la biotecnología y en la industria de la ultrafiltración tradicionalmente se ha utilizado la separación en función del tamaño de mezclas proteicas donde la relación entre las masas moleculares de proteína tiene que ser de al menos alrededor de 10 a 1. Este ha sido un factor limitante en muchas aplicaciones industriales en la industria y, en especial, en la recuperación de productos biofarmacéuticos en la leche de mamíferos transgénicos. Se han hecho investigaciones importantes para la optimización de los sistemas de ultrafiltración por medio de la alteración de las condiciones fisicoquímicas (es decir, pH y fuerza iónica) para lograr selectividades más altas (Van Reis et al. (1997)).

10 De forma más específica, la filtración en profundidad (DF, por sus siglas en inglés) y la microfiltración de flujo tangencial (MF TFF, por sus siglas en inglés) son dos técnicas de filtración adoptadas ampliamente que están relacionadas, pero que difieren en su manipulación de la mecánica del flujo funcional. En general, en procesos de DF, la corriente de alimentación se introduce preferiblemente de forma perpendicular con respecto a la superficie de la membrana. Las sustancias más pequeñas que los poros de la membrana pueden quedar atrapadas en la superficie de la membrana o dentro de la matriz de la membrana, mientras que el filtrado pasa a través de la membrana. A veces denominada filtración de «extremo cerrado» o de «profundidad», la DF se utiliza comúnmente en aplicaciones tales como clarificación, prefiltración, filtración estéril y extracción de virus. Además, la mayoría de los filtros de profundidad utilizados en la industria farmacéutica son desechables.

15 Alternativamente, en procesos de MF TFF, la corriente de alimentación se introduce de forma paralela con respecto a la superficie de membrana, resultando en un barrido continuo del material fuente de filtración. En condiciones óptimas, las sustancias más pequeñas que los poros de la membrana escapan como filtrado o permeado y las partículas mayores se retienen en el retenido. Debido a la acción de barrido de la MF TFF y la corriente de proceso de flujo cruzado, las técnicas basadas en TFF son menos propensas a sufrir incrustaciones que los procesos DF de la invención, en los cuales las partículas separadas se pueden acumular sobre o en la membrana. Los sistemas TFF exhiben características de rendimiento previsible, fiabilidad y la capacidad de procesar corrientes de alimentación «difíciles», las cuales han contribuido a que esta plataforma se haya establecido como el método de separación preferido para muchas aplicaciones biofarmacéuticas. Los sistemas y membranas de TFF no son desechables, las membranas se limpian entre lotes y se reutilizan. Por este motivo, los sistemas MF TFF se utilizan frecuentemente para separar moléculas pequeñas (1-1000 kD) de partículas más grandes (1µm - 10µm). Sin embargo, la energía y limpieza asociadas con el uso de MF TFF a menudo pueden hacer que su uso en proyectos de grandes volúmenes sea poco práctico.

20 Tal como se mencionó, purificar una proteína recombinante a partir de leche es técnicamente complejo y costoso. El proceso de purificación debe ser reproducible e implicar la menor cantidad posible de etapas de trabajo intensivo, y maximizar el rendimiento de la proteína objetivo tal como se mide por su actividad biológica. Un proceso de purificación ideal optimiza el rendimiento mientras mantiene el costo de fabricación bajo.

25 De forma clara, permanece entonces la necesidad de desarrollar procesos a gran escala adicionales para la purificación óptima de proteínas a partir de leche transgénica o sistemas de cultivo de células hospedadoras que resuelvan los problemas cuantitativos y cualitativos relevantes. La presente invención resuelve y satisface estas necesidades mediante la divulgación de un proceso de purificación que, en parte, depende de una etapa de precipitación selectiva y filtración en profundidad que facilita la extracción de grandes cantidades de compuestos contaminantes/impuros, mejorando la eficacia, reduciendo el costo y acelerando el procesamiento a partir de una corriente de alimentación dada.

30 Según los métodos de la presente invención, se hicieron mejoras para optimizar las condiciones a efectos de aumentar las propiedades de exclusión por tamaño potenciales. Diversas partículas en la leche, tales como la caseína y la grasa, son micelas. Estas micelas se pueden manipular mediante condiciones de tampón y forzar a que aumenten o reduzcan su tamaño. Esta manipulación de tampón se utiliza para aumentar la eficacia de la separación del proceso de filtración en profundidad. Estos procesos posibilitan el desarrollo de una filtración en profundidad de alto rendimiento (DF) a partir de diversas corrientes de alimentación incluida la leche. Una molécula de interés que se puede purificar a partir de un caldo de cultivo celular o una corriente de alimentación de leche transgénica es la antitrombina recombinante humana. Otras moléculas de interés incluyen sin limitación, albúmina humana, alfa-1-antitripsina, anticuerpos, fragmentos Fc de anticuerpos y moléculas de fusión donde una proteína albúmina humana actúa como la molécula vehículo. El sistema DF resultante se emplea a lo largo de la presente invención para mejorar los intentos de clarificación y fraccionamiento incluso a partir de los niveles alcanzados mediante TFF.

35 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el procesamiento de rhAT según las técnicas de filtración en profundidad de la invención.

Las Figuras 2A - 2D muestran el rendimiento volumétrico con respecto a la resistencia de la presente invención para una corriente de alimentación de interés.

La Figura 3 muestra un gel de SDS PAGE (siglas en inglés para electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio) no reducido que demuestra la cantidad de recuperación de rhAT a partir de una matriz de DF.

5 La Figura 4 muestra un gel de SDS de recuperación de rhAT que utiliza un filtro grado M403 (5 µm) para la filtración en profundidad / clarificación de leche entera.

La Figura 5 muestra un diagrama de flujo del proceso de filtración completo a través de microfiltración, ultrafiltración y filtración aséptica final. La filtración en profundidad se producirá en la etapa de microfiltración.

10 La Figura 6 muestra el proceso de generar un animal transgénico capaz de producir una proteína de interés en su leche.

La Figura 7 muestra un diagrama del sistema DF.

La Figura 8 muestra una gráfica de filtración en profundidad de rhAT del rendimiento volumétrico con respecto a la resistencia con un filtro M103 (10µm).

15 La Figura 9 muestra una gráfica de filtración en profundidad de rhAT del rendimiento volumétrico con respecto a la resistencia con un filtro M453 (2,5µm).

La Figura 10 muestra un gel de SDS de rhAT en comparación con una pasada de filtración TFF doble.

La Figura 11 muestra un gel de SDS de rhAT de un experimento con TFF y dos experimentos con DF diferentes, uno testigo y uno tratado con calor.

20 Las Figuras 12A - 12B muestran un cromatograma de SEC (siglas en inglés para cromatografía de exclusión por tamaños) de rhAT recuperada.

La Figura 13 muestra una porción ampliada del cromatograma de SEC de rhAT recuperada por DF en comparación con métodos alternativos.

La Figura 14 muestra un cromatograma de SEC de rhAT recuperada por DF en comparación con métodos alternativos de MF TFF.

25 Compendio de la invención

En pocas palabras, el objetivo de la presente invención es utilizar técnicas de filtración en profundidad (DF) para lograr una clarificación y fraccionamiento mejorados de una proteína de interés.

30 Es decir, mejorar las eficacias de separación de una proteína de interés a partir de una corriente de alimentación inicial utilizando DF. De forma más específica, un objeto de la presente invención es proporcionar un método de filtración en profundidad y una serie de reactivos que aumentan sustancialmente la efectividad de dicha actividad de filtración a partir de leche o fluido de cultivo celular como corriente de alimentación de partida.

35 Una proteína de interés, y utilizada como ejemplo en la presente, es la antitrombina humana recombinante. El fin de los métodos de la presente invención es pasar la proteína objetivo, antitrombina humana recombinante (rhAT) y retener las principales proteínas de la leche contaminantes de la forma más eficaz posible. Según la presente invención, las proteínas de la leche contaminantes incluyen IgG, lactoferrina, albúmina, caseína, lactoglobulina y lactalbúmina que se extraen a partir de una proteína de interés a granel clarificada. Los métodos de la presente invención utilizan rhAT como ejemplo, pero se pueden utilizar para otras proteínas de interés.

40 Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, la tecnología de filtración desarrollada y proporcionada en la presente proporciona un proceso para clarificar y fraccionar la proteína recombinante deseada u otra molécula de interés de los componentes naturales de la leche o contaminantes de la misma. El intermediario a granel clarificado resultante es un material de alimentación adecuado para técnicas de purificación tradicionales tales como cromatografía que se utilizan a continuación del proceso de DF para producir el producto en su formulación final y pureza útil para aplicaciones médicas.

45 Un protocolo preferido de la presente invención emplea tres operaciones de unidad de filtración que clarifican y fraccionan el producto a partir de un volumen de leche transgénica dado que contiene una molécula de interés. La etapa de clarificación extrae la materia en partículas más grandes, tales como glóbulos de grasa y micelas de caseína del producto. Las etapas de concentración y fraccionamiento a continuación extraen la mayor parte de las moléculas pequeñas, incluidas la lactosa, minerales y agua, para aumentar la pureza y reducir el volumen de la composición de producto resultante. El producto del proceso DF se concentra a medida hasta un nivel adecuado para una purificación posterior óptima y una estabilidad general del producto. Este producto clarificado a

50

5 continuación se filtra de forma aséptica para garantizar una carga biológica mínima y mejorar la estabilidad del producto durante períodos de tiempo prolongados. El producto a granel tendrá una pureza de entre 65 % y 85 % y pueden contener componentes tales como albúmina, proteínas de lactosuero ( $\beta$  Lactoglobulina,  $\alpha$  Lactalbúmina y BSA [siglas en inglés para seroalbúmina bovina]) y niveles bajos de grasa y caseína residuales. Este producto parcialmente purificado es un material de alimentación de partida ideal para técnicas cromatográficas posteriores convencionales.

10 Los productos típicos con los cuales se puede utilizar la presente invención para procesarlos comprenden otras proteínas recombinantes de interés producidas de forma transgénica, que incluyen sin limitación: antitrombina, rhAT, anticuerpos de IgG1, proteínas de fusión (por ej.: fusión de eritropoyetina - albúmina humana - «HEAP» o Albúmina humana - Eritropoyetina; o, un  $\beta$ -Interferón - rhAT), alfa-1-antitripsina, IgG4, IgM, IgA, porciones Fc, moléculas de fusión que contienen un péptido o polipéptido unido a un fragmento de inmunoglobulina. Otras proteínas que se pueden procesar mediante la presente invención incluyen proteínas recombinantes, hormonas exógenas, proteínas endógenas o proteínas biológicamente inactivas que después se pueden procesar para restaurar su función biológica. Entre estos procesos se incluyen, sin limitación, la hormona de crecimiento humana, antiqumotripsina, 15 albúmina humana recombinante, decorina, urocinasa humana, tPA y prolactina.

Además, según la presente invención, las alteraciones en la concentración de sal (sulfato de amonio o EDTA) difieren con respecto a la técnica anterior y sirven para mejorar la pureza disponible según aquellos que utilizan los métodos de la presente invención.

20 Según realizaciones adicionales de la presente invención, las técnicas de DF proporcionadas en la presente se pueden aplicar a una variedad de industrias diferentes. En la industria de la cerveza, la recuperación de los fondos de los tanques de maduración y fermentación ya se aplica a escala industrial. Durante la última década se ha hecho un progreso considerable con membranas de microfiltración en la clarificación de la cerveza cruda. Las técnicas de la presente invención se pueden aplicar en estos intentos. En relación con el vino, las tecnologías de filtración mejoradas proporcionarán una estabilidad microbiológica y tartárica mejoradas. En la industria de la leche y 25 productos lácteos, las extracción de bacterias y el fraccionamiento de la grasa globular de la leche utilizando técnicas de microfiltración DF mejoradas también son útiles para la producción de leche bebible y leche de quesería.

Un objeto de la presente invención es proporcionar procesos de filtración en profundidad más eficaces para separar especies tales como partículas y moléculas por tamaño, siendo dichos procesos selectivos para las especies de interés, resultando en una purificación varias veces superior de las mismas.

30 Otro objeto es proporcionar procesos de filtración mejorados, incluidos procesos de filtración en profundidad, para separar macromoléculas biológicas, tales como proteínas, de partículas contaminantes, tales como micelas de grasa y caseína, que provocan incrustaciones en los poros y la disminución del flujo.

Estos y otros objetos resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la presente invención, tomando como referencia los dibujos adjuntos.

Descripción de la realización preferida

Las siguientes abreviaturas tienen significados especificados en la memoria descriptiva:

Abreviaturas:

BSA: seroalbúmina bovina

40 CHO: células de ovario de hámster chino

CV: velocidad de flujo cruzado

DF: filtración en profundidad

DV: volumen de diafiltración

IEF: isoelectroenfoque

45 Flujo másico GMH (gramos/m<sup>2</sup>/hora) - también J<sub>M</sub>

Flujo líquido LMH (litros/m<sup>2</sup>/hora) - también J<sub>L</sub>

LPM: litros por minuto

M: molar

MF: microfiltración

NMWCO: corte de peso molecular nominal

NWP: permeabilidad de agua normalizada

PES: Poli(éter)-sulfona

- 5 pH: un término utilizado para describir la actividad de iones hidrógeno de una sustancia química o compuesto según los parámetros científicos conocidos.

PPM: partes por millón

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (dodecil sulfato de sodio)

SEC: cromatografía de exclusión por tamaños

- 10 TFF: filtración de flujo tangencial

PEG: polietilenglicol

TMP: presión de transmembrana

UF: Ultrafiltración

Explicación de los términos:

- 15 Clarificación

La extracción de una materia en partículas de una disolución de forma que la disolución sea capaz de pasar a través de una membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ .

Coloides

- 20 Hace referencia a moléculas grandes que no pasan fácilmente a través de paredes capilares. Estos compuestos ejercen una carga oncótica (es decir, atraen el fluido) y normalmente se administran para restaurar el volumen intravascular y mejorar la perfusión tisular.

Concentración

La extracción de agua y moléculas pequeñas con una membrana de forma tal que la relación entre las moléculas retenidas y las moléculas pequeñas aumente.

- 25 Polarización de concentración

La acumulación de moléculas retenidas (capa de gel) sobre la superficie de la membrana provocada por una combinación de factores: presión de transmembrana, velocidad de flujo cruzado, viscosidad de la muestra y concentración del soluto.

Ley de Darcy

- 30 Una ley empírica que rige el flujo a través de un medio poroso y también describe la relación entre la tasa de flujo, la caída de presión y la resistencia. Los productos auxiliares de filtración normalmente se procesan para proporcionar un intervalo de tasas de filtración que se relacionan estrechamente con la permeabilidad tal como se describe en unidades de Darcy.

Filtración en profundidad

- 35 Un proceso de tratamiento en el cual se utiliza el lecho filtrante entero para atrapar partículas insolubles y suspendidas en sus huecos a medida que el agua fluye a través del mismo. El parche de recolección de muestra tridimensional puede incluir un material capaz de proporcionar una filtración en profundidad o filtración por tamiz de un muestra. La capacidad se determina por la profundidad de la matriz. En la filtración en profundidad, las partículas quedan atrapadas en la matriz y sobre la superficie del medio de filtración.

- 40 Diafiltración

Un proceso de fraccionamiento de lavado de moléculas más pequeñas a través de una membrana, donde la molécula de interés más grande queda en el retenido. Es una técnica conveniente y eficaz para extraer o intercambiar sales, extraer detergentes, separar moléculas libres de las unidas, extraer materiales de peso molecular

bajo o cambiar rápidamente el entorno iónico o pH. El proceso típicamente emplea una membrana de microfiltración que se utiliza para extraer un producto de interés de una suspensión mientras se mantiene la concentración de la suspensión como una constante.

Corriente de alimentación

- 5 El material bruto o disolución bruta proporcionado para un proceso o método que contiene una proteína de interés y que también puede contener diversos contaminantes incluidos microorganismos, virus y fragmentos celulares. Una corriente de alimentación preferida de la presente invención es leche transgénica que contiene una proteína exógena de interés.

Torta de filtración

- 10 Sólidos retenidos y medios de filtración en el elemento de filtración.

Flujo de filtrado (J)

Representa la tasa en la que una porción de la muestra ha pasado a través de la membrana.

Velocidad de flujo (V)

- 15 La velocidad en la que el flujo pasa por la superficie de la membrana se considera la velocidad de flujo de fluido. El flujo de producto se medirá a medida que se varíe la velocidad de flujo. La relación entre las dos variables permitirá determinar una ventana de operación óptima para el flujo.

Fraccionamiento

La separación de moléculas preferida basada en un resto físico o químico.

Capa de gel

- 20 La capa microscópicamente delgada de moléculas que puede formarse sobre la parte superior de una membrana. Puede afectar la retención de moléculas por la obstrucción de la superficie de la membrana y reducir así el flujo del filtrado.

Clasificación del tamaño de los poros de la membrana (MPSR, por sus siglas en inglés)

- 25 Una clasificación del tamaño de los poros de la membrana, típicamente presentada como un valor en micrones, indica que las partículas más grandes que la clasificación serán retenidas por la membrana.

Corte de peso molecular nominal (NMWCO, por sus siglas en inglés)

La designación del tamaño (kilodaltons) para las membranas de ultrafiltración. El NMWCO se define como el peso molecular de la proteína globular que se retiene en un 90 % en la membrana.

Límites del peso molecular nominal (NMWL, por sus siglas en inglés)

- 30 Un sistema de clasificación de membranas que indica que la mayoría de las macromoléculas disueltas con pesos moleculares más altos que el NMWL y algunas con pesos moleculares más bajos que el NMWL serán retenidas por la membrana en cuestión.

Permeabilidad de agua normalizada (NWP, por sus siglas en inglés)

- 35 La tasa de flujo de filtrado de agua establecida a una tasa de recirculación específica durante la limpieza inicial del dispositivo de TFF. Este valor se utiliza para calcular la recuperación de la membrana.

Microfiltración

La microfiltración es un proceso de separación sólido-líquido a presión. Según la invención, las técnicas de microfiltración son capaces de extraer sólidos suspendidos en el rango de 0,10-1,0 micrón. En comparación, la ultrafiltración se utiliza normalmente con sólidos en el rango de 0,01-0,10.

- 40 Molécula de interés

Partículas u otras especies de moléculas que se separarán de una disolución o suspensión en un fluido, por ej., 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 se separará determinará el tamaño del poro de la membrana que se utilizará. Preferiblemente, las moléculas de interés son de origen biológico o bioquímico o producidas mediante procesos transgénicos o *in vitro* e incluyen proteínas, péptido, polipéptidos, anticuerpos o

- 45

5 fragmentos de anticuerpo. Los ejemplos de orígenes de corriente de alimentación preferidos incluyen leche de mamíferos, cultivo celular de mamíferos y cultivo celular de microorganismos tales como bacterias, hongos y levadura. Cabe señalar también que las especies que se extraerán por filtración incluyen polipéptidos, proteínas, componentes celulares, ADN, coloides, micoplasma, endotoxinas, virus, carbohidratos y otras moléculas de interés biológico no deseables, estén glicosiladas o no.

#### Prerrecurrimiento

Un prerrecurrimiento es una capa delgada, típicamente de entre 1,5 y 3,0 mm, de un auxiliar de filtración que se aplica al tabique antes del proceso de filtración real. En general no se necesita un prerrecurrimiento cuando se utiliza un filtro de profundidad como el tabique

#### 10 Filtración de flujo tangencial

15 Un proceso en el que la mezcla de fluido que contiene los componentes que se separarán por filtración se recircula a velocidades tangenciales altas hacia el plano de la membrana para aumentar el coeficiente de transferencia de masa para la retrodifusión. En dichas filtraciones, se aplica una caída de presión a lo largo de la longitud de la membrana para provocar que el fluido y los solutos filtrables fluyan a través del filtro. Esta filtración se lleva a cabo de forma adecuada como un proceso en lotes así como un proceso de flujo continuo. Por ejemplo, se puede hacer pasar la disolución de forma repetida por la membrana mientras que dicho fluido que pasa a través del filtro se extrae de forma continua hacia una unidad separada o se pasa la disolución una vez por la membrana y el fluido que pasa a través del filtro se procesa de forma continua más adelante.

#### Recuperación

20 La cantidad de una molécula de interés que se puede recuperar tras el proceso. En general, se expresa como un porcentaje del material de partida o rendimiento.

#### Retenido

La porción de la muestra que no pasa a través de la membrana, también conocida como concentrado. El retenido se recircula durante la TFF.

25 La industria de productos biológicos muestra una preocupación creciente por la seguridad y pureza de los productos, así como el costo de las mercaderías. La utilización de DF, según la presente invención, es un método rápido, más económico y eficaz para la separación de biomoléculas. Se puede aplicar a una amplia gama de campos de la biología como la inmunología, química de proteínas, biología molecular, bioquímica y microbiología.

30 Cabe señalar también que los productos biofarmacéuticos manipulados genéticamente se purifican a partir de un sobrenadante que contiene una variedad de contaminantes diversos de la célula hospedadora. La cromatografía líquida en fase inversa de alto rendimiento (RP-HPLC, por sus siglas en inglés) es otro método que se puede utilizar para la purificación proteica dado que puede separar de forma eficaz especies moleculares que son excepcionalmente similares entre sí en términos de estructura o peso. Se han publicado procedimientos que utilizan RP-HPLC para muchas moléculas. McDonald y Bidlingmeyer, "Strategies for Successful Preparative Liquid Chromatography", PREPARATIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY, Brian A. Bidlingmeyer (Nueva York: Elsevier Science Publishing, 1987), tomo 38, págs. 1-104; Lee et al., Preparative HPLC. En el 8º Simposio de biotecnología, Pt. 1, 593-610 (1988). Sin embargo, a escala comercial la RP-HPLC no es tan rentable ni eficaz como la presente invención.

40 La presente invención proporciona los resultados de la clarificación de leche de cabra transgénica utilizando filtración de «extremo cerrado» o «filtración en profundidad». Hasta el uso de estas sales tampón específicas en la leche, la misma no se podría clarificar de forma eficaz utilizando DF debido a que el tamaño de la micela de caseína era demasiado pequeño para quedar retenido en estos filtros gruesos. Los filtros finos capaces de retener la caseína se obstruían rápidamente y no se podían utilizar con eficacia. Según una realización preferida de la presente invención, la leche de un animal lechero transgénico, una cabra, se purificó en un material a granel clarificado utilizando filtración en profundidad. La ventaja de la filtración en profundidad con respecto a la filtración de flujo tangencial es que no se necesita recirculación para la filtración del proceso. El líquido simplemente se bombea a través del sistema y el filtrado sale por la corriente posterior del filtro designado. Los elementos de filtro luego se desechan, eliminado así la necesidad de limpiar los filtros. Además, la leche que se clarifica utilizando filtración en profundidad se produce en una única etapa, en oposición al largo proceso de recirculación requerido por la filtración de flujo tangencial u otros esquemas de filtración. Se podrían aplicar también usos similares de las realizaciones de la presente invención para aislar una proteína de interés a partir de una corriente de alimentación de cultivo celular.

#### Etapas del proceso

Las etapas del proceso a partir de mamíferos transgénicos incluyen las siguientes:

1. Recolección de la leche, recolección de cada animal
2. Diluir la leche 1:1 con sulfato de amonio 3,8M
3. Llevar a cabo la filtración en profundidad / filtración aséptica por 0,2 um

#### Recolección del permeado

- 5 La presente invención contempla en especial aplicaciones de filtro de un tipo donde el medio de filtración en general no se reutiliza sino que se desecha junto con los sólidos en partículas extraídos del fluido que se está filtrando. Dado que los sólidos en partículas representan un componente de desecho necesario, la cantidad total de sólido que se desechará a partir de la aplicación de filtración se puede minimizar mejor reduciendo la cantidad de medios de filtración que acompañan a los sólidos en partículas y/o aumentando la cantidad de sólidos retenidos por unidad de volumen de medio de filtración.

10 Para aplicaciones de filtro del tipo mencionado anteriormente, se han utilizado desde hace tiempo medios de filtración donde se disponen capas delgadas y abiertas de resistencia en húmedo en superficies opuestas de los medios de filtración. La estructura relativamente delgada y abierta de las capas de resistencia en húmedo es deseable para permitir que se filtre el flujo máximo de fluido a través de los medios de filtración. Típicamente, se disponen una o más capas de material de tabique de filtro entre las capas de resistencia en húmedo para lograr una filtración en profundidad tal como se describió anteriormente. Además, las capas de resistencia en húmedo típicamente se unen al material de tabique de filtro, preferiblemente mediante un aglutinante o adhesivo que se pulveriza normalmente sobre una superficie del material de tabique de filtro. La capa de resistencia en húmedo luego se presan sobre el material de tabique de filtro a efectos de unir las dos capas entre sí. La unión de las capas es en general necesaria para mantener la continuidad de los medios de filtración, por ejemplo, cuando se reemplazan en el aparato de filtración. La capa de resistencia en húmedo, por sí misma, es típicamente bastante abierta y representa muy poca interferencia para el flujo de líquido que se filtrará a través de los medios de filtración. Sin embargo, el modo en que el aglutinante normalmente se aplica para unir la capa de resistencia en húmedo al material de tabique de filtro típicamente resulta en que el propio aglutinante es una causa de atascamiento o reducción del flujo mucho mayor que la propia capa de resistencia en húmedo.

#### Principios básicos de la filtración en profundidad

30 En general, un medio de filtración en profundidad es el que tiene vías sustancialmente tortuosas que son capaces de recibir y retener material en partículas más pequeñas sobre y dentro de la sección transversal del propio medio de filtración. Preferiblemente, el medio de filtración en profundidad se forma con una matriz de fibras multidireccionales que forman pasajes tortuosos de forma que son capaces de atrapar y retener las partículas más pequeñas. Un medio de filtración en profundidad logra la filtración al menos parcialmente debido a que se provoca que el fluido que pasa a través del medio de filtración cambie de dirección a medida que pasa a través de las fibras multidireccionales. Esto, a su vez, provoca que el material en partículas muy finas en el líquido se deposite y retenga en nichos y grietas incluso aunque las partículas puedan ser más pequeñas que las aberturas en el medio.

35 En la presente se proporciona un proceso de filtración en profundidad para extraer restos celulares, proteínas de la leche contaminantes insolubles, grasas y precipitado de ácido nucleico. Esta etapa proporciona un medio conveniente para extraer de forma económica restos celulares, proteínas contaminantes y precipitado. Para elegir un filtro o esquema de filtración fue necesario garantizar un rendimiento sólido en caso de que se produjeran cambios o variaciones en un punto anterior. Para mantener el equilibrio entre el buen rendimiento de clarificación y rentabilidad escalonada es necesario investigar una amplia variedad de tipos de filtro con medio internos variables. Los filtros adecuados pueden utilizar filtros de celulosa, filtros de celulosa regenerados, fibras de celulosa combinadas con auxiliares de filtración inorgánicos (por ej., tierra de diatomeas, perlita, sílice pirógena), fibras de celulosa combinadas con auxiliares de filtración inorgánicos y resinas orgánicas o cualquier combinación de estos, y filtros poliméricos (los ejemplos incluyen a modo no taxativo, nailon, polipropileno, poliétersulfona) para lograr una extracción eficaz.

#### Filtración en profundidad

50 La filtración en profundidad es un proceso de tratamiento en el cual se utiliza el lecho filtrante entero para atrapar partículas insolubles y suspendidas en sus huecos a medida que el agua fluye a través del mismo. El parche de recolección de muestra puede incluir un material capaz de proporcionar una filtración en profundidad de una muestra. En la filtración en profundidad, las partículas quedan atrapadas en la matriz y sobre la superficie del medio de filtración. Los filtros en profundidad están compuestos por capas aleatorias de materiales metálicos, poliméricos, inorgánicos u orgánicos. Los filtros en profundidad dependen de la densidad y espesor de las capas para atrapar las partículas y fluidos, y en general retienen grandes cantidades de partículas o fluidos dentro de las matrices. Ciertas desventajas de los filtros en profundidad incluyen migración del medio, que es el desvío del medio de filtración sometido a estrés y descarga de partículas en caídas de presión altas. Los ventajas de los filtros en profundidad incluyen el costo reducido, alto rendimiento, capacidad de retención de volumen alto, extracción de un intervalo de

tamaños de partícula y altas tasas de flujo. El extracto de moléculas intracelulares a continuación se separa de la suspensión insoluble restante mediante filtración en profundidad, por ejemplo, utilizando tierra de diatomeas en una prensa filtradora de placas.

5 Con un medio de filtración en profundidad tal como se contempla en la presente invención, el medio de filtración tiene o forma pasajes a través de su matriz que son capaces de atrapar y retener partículas muy pequeñas, preferiblemente en el rango de aproximadamente 1-5 micrones.

10 Las composiciones para filtraciones varían. En aplicaciones de filtración bruta o filtración de grandes volúmenes, se han utilizado medios sueltos tales como tierra de diatomeas (restos corporales de animales extintos denominados diatomeas) y/o perlita (un vidrio volcánico molido) como medio de filtración en profundidad en filtros de hojas a presión. En el pasado se combinaron celulosa, amianto u otras fibras sintéticas con dichos medios sueltos o se utilizaron como materiales de prerrecubrimiento para evitar la migración de las partículas auxiliares de filtración a través del soporte de tamiz de filtro. También se han utilizado membranas de fibra de celulosa porosas, membranas cerámicas, resinas aglutinantes de resistencia en húmedo y resinas aglutinantes de resistencia en seco.

15 A efectos de garantizar una eficacia continua de las técnicas de filtración en profundidad de la invención, también es importante que el medio de filtración permanezca abierto en su superficie superior o, dicho de otra forma, que no sea obstruido por los componentes del propio medio de filtración tales como la capa de resistencia en húmedo o un aglutinante asociado o por el material en partículas depositado a partir del líquido que se está filtrando. La innovación de la presente invención garantiza que el medio de filtración en profundidad permanezca abierto al evitar el uso de adhesivos o materiales de resistencia en húmedo formados sobre la superficie superior del medio de filtración que recibe el líquido que se va a filtrar. Por consiguiente, es particularmente importante entender que la filtración en profundidad se logra por medio de la capa de tabique de filtro de la presente invención y que la superficie superior de la propia capa de tabique de filtro permanece expuesta para recibir el líquido que se va a filtrar.

25 En relación con el tamaño de partículas, en general se contempla que la filtración en profundidad a efectos de la presente invención incluya aplicaciones donde el tamaño de partículas mínimo es de aproximadamente 50 micrones o menor, siendo normalmente una porción sustancial de los sólidos en partículas menor que 50 micrones. De forma más preferible, la filtración en profundidad para la presente invención se contempla con sólidos en partículas que tienen un tamaño mínimo en el rango de aproximadamente 1-25 micrones. Tal como resultará evidente a partir de la siguiente descripción, el medio de filtración en profundidad de la presente invención es particularmente útil para extraer una porción sustancial de dichos sólidos en partículas.

30 Según la invención, hay al menos dos conceptos importantes que cooperan para formar la base de la presente invención. El primero implica la disociación de las micelas de caseína en la leche con EDTA y la clarificación de la corriente de alimentación con un filtro en profundidad. El segundo implica la aglomeración de las micelas de caseína con sulfato de amonio y la clarificación de la leche utilizando un filtro en profundidad. La tecnología es un proceso nuevo que combina métodos existentes en una nueva forma para producir un resultado favorable. El uso de la filtración en profundidad para clarificar la leche no era fiable hasta que la leche se trató con un tampón para alterar el estado de las micelas de caseína. Las realizaciones preferidas de la presente invención se pueden poner en funcionamiento en un sistema cerrado con un diseño de deslizamiento simple que mejora en gran medida la capacidad de los usuarios para mantener un funcionamiento en conformidad con las Buenas Prácticas de Fabricación («GMP», por sus siglas en inglés) y/o la contención de los agentes que representan un peligro biológico. El proceso también es más rápido y requiere menos esfuerzo de mano de obra. Típicamente, las tasas de flujo para la filtración están entre 60 - 80LMH y entre 30 - 40 litros/m<sup>2</sup> de leche que se pueden procesar en aproximadamente 2 horas.

45 El permeado resultante consiste en leche clarificada que contiene diversas proteínas de la leche solubles y la proteína transgénica de interés. El retenido resultante (o capa de torta) que consiste en una suspensión de proteínas insolubles y grasa se puede lavar o solubilizar y pasar a través de un filtro en profundidad para recolección. La capa de torta restante contiene los componentes insolubles restantes de la leche que normalmente se desechan.

50 Los métodos de filtración del tipo contemplado en la presente invención se llevan a cabo en un aparato de filtración. El aparato de filtración se denomina comúnmente prensa filtradora e incluyen placas de filtración relativamente móviles. Una de las placas de filtración se conecta con una entrada para recibir el fluido que se va a filtrar. Típicamente, el fluido es un líquido e incluso más típicamente agua o fluidos basados en agua que contienen sólidos en partículas que se extraerán durante el proceso de filtración. La otra placa de filtración se conecta con una salida para recibir el fluido que pasa a través del aparato de filtración y que tiene los sólidos en partículas extraídos. Por lo tanto, el fluido filtrado se puede desechar o recircular para uso adicional, dependiendo de la aplicación específica en la que se emplea el aparato de filtración.

55 Para reemplazar el medio de filtración, se interrumpe temporalmente el flujo de fluido a través del aparato de filtración, se vacía de fluido el ensamblaje de filtración y las placas de filtración se separan. A continuación, se retira el medio de filtración del aparato de filtración. Al mismo tiempo, se toma una porción de superficie nueva del medio

de filtración, por ejemplo, desde un carrete de alimentación en el aparato de filtración. En dicho momento, las placas de filtración se vuelven a prensar y enganchar entre sí para capturar y sellar el medio de filtración nuevo entre ambas placas y la operación de filtración se retoma con el flujo de fluido adicional desde la fuente.

5 Los materiales de microfibras adecuados según la presente invención incluyen vidrio, poliéster, polipropileno, polietileno, nailon y otras fibras sintéticas que tienen en general características similares. Se cree en general que todas estas fibras sintéticas están disponibles en las longitudes cortas y largas descritas anteriormente. Típicamente, las fibras sintéticas son relativamente lineales y redondas al tiempo que resisten normalmente la absorción de líquidos debido a su composición sintética.

10 Una vez finalizada la precipitación, a continuación se lleva a cabo la filtración en profundidad en cada alícuota utilizando el mismo aparato de filtración. Resultará evidente tras la lectura de la presente memoria descriptiva que los procesos de la presente invención son ampliables, en una gama que va desde la escala más pequeña (por ej., pasadas de aproximadamente 5-10 litros) hasta preparaciones a escalas comerciales, tales como pasadas de producción de 1.000 a 5.000. Según la presente invención el proceso se ampliará de forma lineal. Las etapas iniciales del proceso (precipitación, filtración en profundidad y ultrafiltración) se amplían con el volumen de la corriente de alimentación mientras que la cromatografía de intercambio aniónico y las etapas posteriores se amplían con la entrada de partículas víricas.

15 Se puede agregar filtración estéril al presente proceso para eliminar la carga biológica. El filtro estéril se puede construir con una variedad de materiales distintos que se conocen en la técnica y están disponibles para el experto. Estos materiales pueden incluir, a modo no taxativo, polipropileno, celulosa, celulosa regenerada, ésteres de celulosa, nailon, poliétersulfona o cualquier otro material que presenta una escasa unión con el producto. El filtro puede tener una única capa de membrana o incorporar un prefiltro de un material igual o diferente. El producto se puede mantener congelado o a aproximadamente 4° C para formulación y relleno posteriores.

20 Según otra realización, también se puede agregar una etapa de purificación ortogonal para obtener una depuración de impurezas, así como una etapa de depuración de agentes adventicios. Las etapas de purificación ortogonal no son necesarias inevitablemente y el experto en la técnica puede evaluarlas e implementarlas en función de la necesidad. Las etapas potenciales incluyen cromatografía de intercambio catiónico de flujo continuo, adsorción en fase inversa y cromatografía de hidroxipatita. También se puede considerar una etapa de cromatografía de intercambio aniónico para extraer impurezas adicionales. Esta etapa se puede poner en funcionamiento en modo de unión/elución o flujo continuo. La etapa se puede aplicar después de la etapa de ultrafiltración finalizando la UF con una diafiltración en un tampón adecuado tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés).

25 Según la presente invención, se selecciona una proteína recombinante, rhAT, para utilizar en el desarrollo de nuevas técnicas de clarificación. Esta proteína se expresa en la leche transgénica que se debe clarificar antes de la purificación. La filtración en profundidad utilizando medios de filtración en profundidad ofrece una alternativa atractiva a la centrifugación o filtración de flujo tangencial. Es de uso sencillo, tiene costos iniciales bajos asociados con el montaje y es desechable. El objetivo de la clarificación/filtración aséptica de la leche es aislar los componentes solubles de la leche, denominados proteínas de lactosuero y proporcionar un producto microbiológicamente estable. Las proteínas de lactosuero incluyen IgG, lactoferrina, albúmina, caseína residual soluble, lactoglobulina, lactalbúmina y la proteína rhAT recombinante. La leche también contiene materia en partículas tales como glóbulos de grasa, micelas de caseína y restos celulares. En referencia a la Figura 1, las partículas se pueden separar de las proteínas de lactosuero, una vez finalizada la precipitación, al pasarlas a través de un filtro en profundidad de 5 µm.

30 Según una realización preferida de la presente invención, una etapa esencial para clarificar una corriente de alimentación de leche utilizando filtros en profundidad es precipitar parcialmente las micelas de caseína utilizando sulfato de amonio. En presencia de 1,9M de sulfato de amonio a pH 6,5, la caseína comienza a aglomerarse y el aglomerado se retiene fácilmente en los filtros en profundidad más abiertos. Además, otras proteínas de la leche menos solubles precipitan, la IgG, a modo de ejemplo, también se extrae utilizando este método. Por última, los glóbulos de grasa y restos celulares se extraen fácilmente mediante el filtro, proporcionando proteínas de lactosuero clarificadas en el filtrado. Según la invención, a continuación el filtrado se puede filtrar asépticamente y almacenar a 4C° antes de la purificación.

35 Según una realización de la presente invención, se proporcionan técnicas de DF de la invención y posteriormente técnicas de purificación mejoradas que conducen a una composición terapéutica de grado farmacéutico que es bioactiva. Este proceso se puede lograr clarificando adicionalmente una corriente de alimentación fraccionada de DF utilizando una serie de columnas de cromatografía de intercambio iónico. Dichas columnas contendrán preferiblemente una resina de intercambio pero también puede ser una resina de afinidad, mientras los contaminantes se capturan en columnas adicionales o se extraen por lavado. La molécula de interés a continuación se recoge y se prepara para administración.

- 5 Según realizaciones preferidas de la presente invención, se llevaron a cabo pasadas de procesamiento de DF utilizando una cámara de prueba de 90 mm y un disco de medio de filtración. Los experimentos iniciales reconocieron cuatro grados diferentes de medios que variaban de 2,5µm hasta 15µm de «tamaño de poro». Tras seleccionar el grado ideal del medio, la leche clarificada se purificó y utilizó en la primera etapa del proceso de purificación a escala reducida. Los resultados de esta porción del experimento confirmaron que la tecnología es comparable con la leche clarificada más convencional que utiliza filtración en flujo tangencial.

## Materiales y métodos

<i>Materiales</i>	
Descripción	Número de pieza
• Cámara de prueba de 90 mm c/ manómetro	M90 PD
• Bomba Masterflex L/S (10-600RPM)	07524-40
• Tubería de silicona No. 14 Masterflex	96420-14
• Medio de filtración Ertel Elsop - 2,5µm	M453
• Medio de filtración Ertel Elsop - 5µm	M403
• Medio de filtración Ertel Elsop - 10µm	M103
• Medio de filtración Ertel Elsop - 15µm	M053
• Prefiltro malla 2mm	N/A
• Sulfato de amonio 3,8M, Fosfato sódico 0,2M,	pH 6,5

## Leche de cabra transgénica

- 10 La leche transgénica se recogió por separado de cada una de las cabras transgénicas y se mantuvo a 4 - 8 °C hasta la clarificación (<4 días, a menos que se indique lo contrario).

<b>Número de cabra</b>	<b>Fecha de recolección</b>	<b>Temp. de almacenamiento</b>
G0881	Ago. - Dic. 2005	4-8 °C
G0737	Ago. - Dic. 2005	4-8 °C
C248	Ago. - Dic. 2005	4-8 °C
C239	Ago. - Dic. 2005	4-8 °C
B121	Ago. - Dic. 2005	4-8 °C

## Clarificación - Selección de medios

- 15 Se llevaron a cabo cuatro experimentos de clarificación separados utilizando filtración en profundidad (DF) con parámetros de funcionamiento similares. El objetivo de este experimento fue el de observar el efecto de los diferentes grados de los medios en la clarificación. Inicialmente se agregaron 150ml de leche al depósito de alimentación desinfectado y se agregaron 150ml de sulfato de amonio 3,8M al depósito de tampón desinfectado del sistema de microfiltración (MF). A continuación se utilizaron una bomba de cabezal doble y un mezclador estático para mezclar las dos corrientes en relaciones iguales. Después se hizo pasar la mezcla a través del grado de medio seleccionado y se recogió el filtrado. La leche clarificada final se filtró de forma aséptica y se almacenó en una botella de PETG (siglas en inglés para tereftalato de polietileno modificado con glicol) a 4 °C.

## Métodos analíticos

- HPLC en fase inversa (RPC)

La cromatografía en fase inversa se llevó a cabo en cada una de las muestras para evaluar la concentración de la proteína rhAT aislada mediante esta etapa del proceso.

- 5 • SEC HPLC (RPC)

La cromatografía de exclusión por tamaños se llevó a cabo en cada una de las muestras para evaluar la cantidad de monómero de rhAT en cada muestra.

- SDS PAGE no reducida (RPC)

- 10 La SDS PAGE se llevó a cabo en cada una de las muestras para evaluar la composición proteica de la leche clarificada.

## Resultados

## Clarificación - Selección de medios

- 15 La clarificación de leche transgénica con rhAT se llevó a cabo utilizando diferentes medios de filtración en profundidad entre 2,5  $\mu\text{m}$  y 15  $\mu\text{m}$  en condiciones de flujo similares. Los perfiles de presión para cada pasada se pueden observar a continuación en las gráficas 1-4. Los resultados de rendimiento con respecto a resistencia se pueden observar desde la parte superior izquierda hasta la parte inferior de la página. Tal como se esperaba, la resistencia aumenta más rápidamente en el grado de filtro más estrecho, M453 (2,5 $\mu\text{m}$ ). La resistencia más baja se puede observar cuando se utiliza M053 (15 $\mu\text{m}$ ). Además, la claridad de filtrado más elevada se observó en M453 (2,5 $\mu\text{m}$ ) y la más baja en M053 (15 $\mu\text{m}$ ). Todas las muestras de leche clarificadas se filtraron de forma aséptica utilizando un filtro de jeringa de 0,2 $\mu\text{m}$  y se registró el rendimiento. Tal como se esperaba, el permeado de MF más claro tuvo el rendimiento más elevado. Por este motivo se eligió el filtro de grado M403 (5 $\mu\text{m}$ ) ya que presentó el mejor equilibrio entre claridad y rendimiento.
- 20

## Composición de la leche:

- 25 La leche de vaca tiene aproximadamente 87 % de agua, 4-5 % de grasa, 5 % de carbohidrato y 3-4 % de proteína. La leche de cabra y la leche de oveja tienen un contenido de grasa más bajo pero un contenido de proteína más elevado. La lactosa es el principal carbohidrato en la leche de la mayoría de las especies y el componente menos variable de la leche. El componente de grasa es una mezcla compleja de lípidos secretados como glóbulos compuestos principalmente por un triglicérido rodeado por una membrana de capa doble de lípidos, que ayuda a estabilizar dichos glóbulos de grasa en una emulsión dentro del entorno acuoso de la leche. Más del 95 % del total de lípidos de la leche están en forma de glóbulos que varían de 0,1 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estas gotas de grasa líquida están cubiertas por una membrana delgada, de 8-10 nm de espesor, con propiedades completamente diferentes de las de la grasa de la leche y el plasma. La membrana de glóbulo de grasa (FGM, por sus siglas en inglés) natural es una membrana plasmática apical de la célula secretora que envuelve de forma continua las gotas de lípidos a medida que pasan hacia el lumen. Por lo tanto, los principales componentes de la FGM natural son
- 30
- 35 proteína y fosfolípidos. La principal proteína de la leche es la caseína. Las fracciones de caseína principales son las caseínas (s1) y (s2), -caseína y -caseína. La propiedad que las distingue de todas las caseínas es su baja solubilidad a pH 4,6. Un factor común en la composición es que la caseínas son proteínas conjugadas, la mayoría con grupo(s) fosfato esterificados con residuos serina. La mayoría, si no todas, se encuentra dentro de una estructura denominada *micela*. Su función biológica es la de llevar grandes cantidades de fosfato de calcio altamente insoluble al mamífero lactante en forma líquida y formar un coágulo en el estómago para lograr una nutrición más eficaz. Las micelas son moléculas coloidales con núcleos hidrófobos y superficies enriquecidas con caseína que se mantienen unidas de forma holgada mediante moléculas de fosfato cálcico. Forman grandes aglomerados con diámetros de 90-150 nm. Estos aglomerados son estructuras porosas que ocupan aproximadamente 4 mL/g y 6-12 % de la fracción en volumen total de la leche. La estructura de la micela también contiene minerales, aminoácidos y
- 40
- 45 péptidos bioactivos.

- Las proteínas de lactosuero también incluyen una larga lista de enzimas, hormonas, factores de crecimiento, transportadores de nutrientes y factores de resistencia a enfermedades. Si la proteína producto tiende a asociarse con la grasa o micelas, la purificación se puede simplificar, pero este esquema es infrecuente. Las moléculas de caseína se pueden separar del lactosuero al extraer por precipitación la caseína con ácido (una adición lenta de 0,1-N HCl para bajar el pH de la leche hasta 4,6) o al romper la estructura micelar utilizando hidrólisis parcial de las
- 50
- moléculas proteicas con una enzima proteolítica tal como quimosina. Sin embargo, estos métodos pueden resultar en pérdidas de producto que pueden alcanzar el 40-60 %, lo cual conduce a rendimientos generales considerablemente más bajos (5-25 %) y baja actividad biológica. En cambio, las disoluciones de sal utilizadas en

este método precipitan las micelas de caseína al tiempo que no crean una pérdida de producto siempre que la proteína de interés permanezca soluble.

#### Leche como corriente de alimentación

- 5 La leche puede ser el producto de un mamífero transgénico que contiene una sustancia biofarmacéutica u otra molécula de interés. En una realización preferida, el sistema se diseña de forma tal que sea altamente selectivo para la molécula de interés. La etapa de clarificación extrae la materia en partículas más grandes, tales como glóbulos de grasa y micelas de caseína de la corriente de alimentación de leche. Las etapas de concentración/fraccionamiento extraen la mayor parte de las moléculas pequeñas, incluidas la lactosa, minerales y agua, para aumentar la pureza y reducir el volumen del producto. El producto del proceso DF a continuación se concentra hasta un nivel adecuado para una purificación posterior óptima y una estabilidad general del producto. Este producto concentrado, que contiene las moléculas de interés, a continuación se filtra de forma aséptica para garantizar una carga biológica mínima (es decir, endotoxina) y mejorar la estabilidad de la molécula de interés durante períodos de tiempo prolongados. Según la realización preferida de la presente invención, el producto a granel tendrá una pureza de entre 35 % y 65 % y pueden contener componentes tales como anticuerpos de cabra (tales como cabras transgénicas), proteínas de lactosuero ( $\beta$  Lactoglobulina,  $\alpha$  Lactalbúmina y BSA) así como niveles bajos de grasa y caseína residuales. Este producto parcialmente purificado es un material de alimentación de partida ideal para técnicas cromatográficas convencionales posteriores para seleccionar y aislar adicionalmente las moléculas de interés que podrían incluir, sin limitación, una proteína recombinante producida en la leche, una inmunoglobulina producida en la leche o una proteína de fusión.
- 10
- 15
- 20 Según la presente invención, se demuestra el objetivo de separar la proteína de interés de las proteínas contaminantes utilizando DF. La meta de esta clarificación es retener la grasa, caseína y proteínas precipitadas no deseadas mientras pasa el producto soluble y las proteínas de la leche. Los resultados de RPC y SDS gel muestran de forma concluyente que los componentes contaminantes de la leche se pueden reducir de forma eficaz durante la clarificación. Se extrae todo excepto el producto y las proteínas de la leche solubles de forma eficaz utilizando el filtro de DF de 5 $\mu$ m y los métodos de la invención.
- 25

#### Clasificación del tamaño de los poros de la membrana (MPSR, por sus siglas en inglés)

- El tamaño de poro de DF y la condición del tampón de la leche tienen un rol importante en la eficacia de la clarificación. Se evaluaron diversos tamaños de poro de DF incluidos 2,5 $\mu$ m, 5,0 $\mu$ m, 10 $\mu$ m y 15 $\mu$ m. Si el tamaño del poro es demasiado pequeño como en el caso de 2,5 $\mu$ m, el rendimiento y el flujo disminuyen, sin embargo, la claridad del permeado es buena. Se evaluó la calidad, rendimiento y flujo del permeado de cada tamaño de poro mayor. Los filtros de 2,5 $\mu$ m, 5,0 $\mu$ m, 10 $\mu$ m retuvieron todos la mayor parte de la grasa y los componentes de la leche precipitados. El filtro de 15 $\mu$ m no se pudo utilizar de forma eficaz para esta filtración dado que la calidad del permeado era más baja y una porción de la grasa pasó a través de la membrana creando un permeado opacificado. El filtro de 5,0 $\mu$ m exhibió el mejor rendimiento, flujo y calidad de permeado inicialmente y después de la optimización. El tamaño del poro de este filtro resultó ser el tamaño más grande que se puede utilizar, que aún es capaz de retener los contaminantes de la leche insolubles.
- 30
- 35

En relación con las Figuras 2A-2D, las mismas demuestran la resistencia del filtro y el rendimiento volumétrico de acuerdo con la realización preferida de la invención.

- 40 En relación con la Figura 3, se proporciona una SDS PAGE no reducida que confirma que la mayor parte de la rhAT se recuperó en el filtrado de cada uno de los experimentos según la presente invención. También cabe señalar la similitud entre cada una de las corrientes de filtrado (Fig. 3).

#### Clarificación / Purificación

- En relación con la Figura 4, luego de elegir el filtro grado M403 (5,0 $\mu$ m) para la filtración en profundidad/clarificación de la leche entera, se agruparon varios lotes, se concentraron y se diafiltraron utilizando una membrana de ultrafiltración de 30kD. Esta muestra agrupada luego se purificó utilizando una columna de heparina de 16ml. La leche clarificada de la presente clarificación de 500 K y el proceso de TFF doble con 0,1  $\mu$ m también se compararon. En la Fig. 11, la SDS PAGE muestra que los carriles 2, 7 y 11 contienen la fracción de elución de rhAT purificada. Tal como se puede observar, cada una es similar en composición excepto la del carril 11 donde se puede observar un aglomerado. Este aglomerado fue más evidente en la muestra de TFF doble con 0,1 $\mu$ m.
- 45

- 50 En los datos para la invención proporcionados en la presente se muestra que la clarificación utilizando filtración en profundidad es fiable y puede optimizar la purificación de varias moléculas a partir de una corriente de alimentación de leche. Se señala que según las realizaciones preferidas de la presente invención, los procesos son ampliables, económicos y tienen un rendimiento de producto alto sostenido (>90 %).

- 55 Otros datos indican que la ampliación del disco de 90mm a un cartucho lenticular de 1,1pies<sup>2</sup> mejora la eficacia del proceso global. Este cartucho tendrá el potencial de clarificar 3 litros de leche entera.

## Procesamiento de la leche

- Según los métodos de la presente invención, es preferible si la temperatura de la leche se eleva hasta 15-25 °C después de agruparla. La leche se agrupa en un depósito y se prepara un volumen igual de tampón de sal en un segundo depósito. A continuación se conectan los dos depósitos a una bomba y un mezclador estático en línea.
- 5 Luego de conectar el conducto de corriente de alimentación al elemento de filtro, la bomba se enciende para combinar la leche y el tampón antes de la filtración. El uso del mezclador estático es importante dado que el tiempo de mezclado y resonancia es uniforme a lo largo de toda la filtración. Mezclar la leche y el tampón en un tanque a granel antes de la filtración es menos deseable dado que el tiempo que la mezcla descansa antes de la filtración es variable. La bomba se ajusta hasta la tasa de flujo deseada en función del flujo promedio de 50LMH. Después de 5 minutos, se toma(n) la(s) muestra(s) de permeado inicial(es) y se verifican las presiones críticas y las tasas de flujo.
- 10 La DF se lleva a cabo a 50LMH con menos de 15psi de presión de transmembra a lo largo de la filtración. La temperatura de la leche debe permanecer en 20 °C ± 5. Luego de que se haya consumido el volumen total de leche y tampón, se agrega un volumen de tampón igual al 10 % del volumen de leche de partida al filtro para garantizar que la mayor parte de la proteína soluble haya pasado al permeado.
- 15 Tras finalizar la filtración, el recipiente de recolección del permeado se desconecta, los filtros se desechan y el sistema se drena y limpia. El permeado clarificado de DF se filtra de forma aséptica y se almacena a 4 °C antes de la purificación posterior.

## Producción de animal transgénico

- 20 Otros problemas afectan el rendimiento global de cualquier proceso de fabricación que incluye mamíferos transgénicos: estabilidad de las construcciones, control de la expresión y variaciones estacionales en la lactación, entre otros. Una comprensión cabal de la salud y fisiología de las especies de ganado utilizadas es esencial dado que un animal transgénico puede vivir durante 7-10 años y experimentará cambios fisiológicos y diversos entornos a lo largo de su vida a medida que se desarrolla, pare y en última instancia lacta. Los procesos de recuperación deben ser suficientemente sólidos para manejar dichos cambios, pero si los avances en nuestra comprensión de la composición de la leche y las técnicas de bioprocesamiento continúan, dichos desafíos se superarán también.
- 25

- Según la presente invención, la extracción de una molécula de interés de una corriente de alimentación dada en preparación para uso por un usuario final se podría concluir con una serie de etapas de purificación adicionales. En general, se prefiere un proceso de múltiples etapas, pero no es necesario. Un proceso de dos o tres etapas de ejemplo consistiría en un filtro(s) grueso(s) para extraer el precipitado grande y restos celulares, posteriormente se procedería a una segunda etapa de pulido con un filtro(s) con tamaños de poro nominales mayores que 0,2 micrones pero menores que 1 micrón. La combinación óptima será una función de la distribución del tamaño del precipitado así como otras variables. Además, las operaciones de una sola etapa que emplean un filtro relativamente estrecho o centrifugación producen también un producto de buena calidad. Desde un punto de vista más general, cualquier enfoque de clarificación que incluye filtración de extremo cerrado, microfiltración, centrifugación o alimentación de relleno de auxiliares de filtración (por ejemplo, tierra de diatomeas) en combinación con filtración de extremo cerrado o en profundidad, que proporcionan un filtrado de claridad adecuada para no provocar incrustaciones en la membrana y/o resina en las etapas posteriores, será aceptable para poner en práctica dentro de la presente invención.
- 30
- 35

## Protocolos de limpieza y almacenamiento

- 40 La limpieza de los filtros DF no es necesaria ya que son desechables; es una de las ventajas obvias con respecto a sistemas reutilizables que requieren un gran volumen de disolución de limpieza y agua. Luego de finalizar la filtración, los elementos de filtración se extraen y desechan. A continuación, el alojamiento del filtro, el recipiente de alimentación y la bomba son los únicos componentes que requieren limpieza. Se ha demostrado que un ciclo de treinta (30) minutos con hidróxido de sodio 0,5M y posteriormente ácido cítrico 0,3M es eficaz cuando se limpian componentes de acero inoxidable en la industria lechera. Luego de finalizar el ciclo de limpieza, los componentes se enjuagan con agua y los filtros se vuelven a instalar antes del siguiente uso.
- 45

## Producción recombinante

- Una cantidad creciente de proteínas recombinantes se están desarrollando para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Sin embargo, muchas de estas proteínas pueden resultar costosas o difíciles de producir en una forma funcional y/o en las cantidades necesarios mediante el uso de métodos convencionales. Los métodos convencionales implican la inserción de un gen responsable de la producción de una proteína específica en células hospedadoras tales como bacterias, levadura o células de mamíferos, p. ej., células COS o CHO y luego el cultivo de las células en medios de cultivo. A continuación, las células cultivadas sintetizan la proteína deseada. Los sistemas tradicionales de bacterias o levadura pueden no ser capaces de producir muchas proteínas complejas en una forma funcional. Aunque las células de mamíferos pueden reproducir proteínas complejas, en general su cultivo es difícil y costoso y a menudo producen solo cantidades en mg/L de la proteína. Además, las proteínas no
- 50
- 55

secretadas son relativamente difíciles de purificar a partir de células procariontes o de mamíferos dado que no se secretan en el medio de cultivo.

5 En general, la tecnología transgénica presenta un método para producir y secretar una proteína que normalmente no se secreta (un proteína no secretada). El método incluye expresar la proteína a partir de una construcción de ácido nucleico que incluye:

(a) un promotor, p. ej., un promotor específico del epitelio mamario, p. ej., un promotor de proteína de la leche;

(b) una secuencia señal que puede dirigir la secreción de una proteína, p. ej., una secuencia señal de una proteína específica de la leche;

10 (c) opcionalmente, una secuencia que codifica para un porción suficiente de la región codifican del extremo amínico de una proteína secretada, p. ej., una proteína secretada en la leche, para posibilitar la secreción, p. ej., en la leche de un animal transgénico, de la proteína no secretada; y

(d) una secuencia que codifica para una proteína no secretada, donde los elementos (a), (b), opcionalmente (c) y (d) preferiblemente se enlazan de forma funcional en el orden indicado.

15 En realizaciones preferidas: los elementos a, b, c (si está presente) y d son del mismo gen; los elementos a, b, c (si está presente) y d son de dos o más genes.

En realizaciones preferidas la secreción es en la leche de un mamífero transgénico.

En realizaciones preferidas: la secuencia señal es la secuencia señal de  $\beta$ -caseína; el promotor es la secuencia promotora de  $\beta$ -caseína.

20 En realizaciones preferidas la secuencia codificante de proteína no secretada: es de origen humano; codifica para un polipéptido truncado, nuclear o citoplasmático; codifica para la seroalbúmina humana u otra proteína de interés deseada.

25 La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro del conocimiento de la técnica. Tales técnicas se describen en la literatura.

30 Si bien la invención que antecede se describió con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo a los efectos de lograr la comprensión, resultará evidente para los expertos que se pueden realizar determinados cambios y modificaciones. Por consiguiente, la descripción y los ejemplos no deben ser interpretados como limitaciones del alcance de la invención, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

35 Por consiguiente, se entenderá que las realizaciones de la presente invención que proporcionan un método de filtración en profundidad mejorado para generar un rendimiento alto de una molécula de interés a partir de una corriente de alimentación dada son meramente ilustrativas de la aplicación de los principios de la invención. Resultará evidente a partir de la precedente descripción que se puede recurrir a cambios en la forma, métodos de uso y aplicaciones de los elementos divulgados sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## LISTA DE TÉCNICA ANTERIOR

1. Aravindan GR, et al., (1997), *Identification, Isolation, and Characterization Of A 41-Kilodalton Protein From Rat Germ Cell-Conditioned Medium Exhibiting Concentration-Dependent Dual Biological Activities*, ENDOCRINOLOGY 138(8):3259-68.
2. Bracewell D.G. et al., (2004) *Addressing a Whole Bioprocess in Real-Time Using an Optical Biosensor-Formation, Recovery and Purification of Antibody Fragments From a Recombinant E. Coli Host*, BIOPROCESS BIOSYST ENG. 2004 Jul;26(4):271-82. Epub 2004 May 5.
3. Charlton H.R., et al., (1999) *Characterization of a Generic Monoclonal Antibody Harvesting System for Adsorption of DNA by Depth Filters and Various Membranes*, BIOSEPARATION. 8(6):281-91.
4. Christy C., et al., (2002) *High Performance Tangential Flow Filtration: A Highly Selective Membrane Separation Process*, DESALINATION,tomo 144: 133-36.
5. De Jonge, E. et al. (1993), *Filtration Processes in the Cohn Fractionation Process*. BIOTECHNOL BLOOD PROTEINS, 227:49-54.
6. Gabler et al., (1987), *Principles of Tangential Flow Filtration: Applications to Biological Processing*, en **FILTRATION IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY**, págs. 453-490.
7. Ghosh R, et al., (2003) *Parameter Scanning Ultrafiltration: Rapid Optimisation of Protein Separation*, BIOTECHNOL BIOENG., Marzo 20;81(6):673-82.
8. Koros, W.J. et al., (1996), *Terminology for Membranes and Membrane Processes (IUPAC Recommendations 1996)*. PURE & APPL. CHEM. 68: 1479-89.
9. Millesime L, et al., (1996) *Fractionation of Proteins with Modified Membranes*, BIOSEPARATION, Jun;6(3):135-45.
10. Morcol et al., *Model Process for Removal of Caseins from Milk of Transgenic Animals*, BIOTECHNOL. PROG. 17:577-82 (2001).
11. Prado SM, et al., (1999), *Development and Validation Study for the Chromatographic Purification Process for Tetanus Anatoxin on Sephacryl S-200 High Resolution*, BOLL CHIM FARM. 138(7):364-368.
12. Porter, ed., **HANDBOOK OF INDUSTRIAL MEMBRANE TECHNOLOGY**, (Noyes Publications, Park Ridge,Nueva Jersey,(1998)) págs. 160-176.
13. Ramachandra-Rao, H.G. et al., (2002) *Mechanisms of Flux Decline During Ultrafiltration of Dairy Products and Influence of pH on Flux Rates of Whey and Buttermilk*, DESALINATION,tomo 144: 319-24.
14. Reynolds, T. et al., (2003) *Scale-Down of Continuous Filtration for Rapid Bioprocess Design: Recovery and Dewatering of Protein Precipitate Suspensions*, BIOTECHNOL. BIOENG. Ago 20;83(4):454-64

15. Van Holten R.W. et al., (2003), *Evaluation of Depth Filtration to Remove Prion Challenge from an Immune Globulin Preparation*, VOX SANG. Jul;85(1):20-4.
16. Van Reis R. y Zydney A., *Review*, CURR OPIN BIOTECHNOL., (2001) Apr; 12(2):208-11.
17. Zeman, L.J. y Zydney, A.L. (1996), *Microfiltration and Ultrafiltration*, en **PRINCIPLES AND APPLICATIONS**. (Marcel Dekker ed.), Nueva York.

**PATENTES ESTADOUNIDENSES Y PATENTES INTERNACIONALES  
INCORPORADAS POR REFERENCIA**

1. Antonsen, KP et al., Patente estadounidense N.º: US 6.194.553, PURIFICATION OF ALPHA-1 PROTEINASE INHIBITOR.
2. Jain M. et al., Patente estadounidense N.º: 4.351.710, FRACTIONATION OF PROTEIN MIXTURES.
3. Kothe et al., Patente estadounidense 4.644.056, METHOD OF PREPARING A SOLUTION OF LACTIC OR COLOSTRIC IMMUNOGLOBULINS OR BOTH AND USE THEREOF
4. Sandblom R.M. et al., Patente estadounidense N.º: 4.105.547, FILTERING PROCESS.
5. Sherman, L.T. et al., Patente estadounidense N.º: 6.268.487, PURIFICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES FROM MILK.
6. Udell, M. et al., Patente europea N.º: EP1115745(WO0017239), PURIFICATION OF FIBRINOGEN FROM FLUIDS BY PRECIPITATION AND HYDROPHOBIC CHROMATOGRAPHY.
7. Van Reis R.M., et al., Patente estadounidense N.º: 6.555.006, TANGENTIAL-FLOW FILTRATION SYSTEM.
8. Van Reis R.M., et al., Patente estadounidense N.º: 6.221.249, TANGENTIAL-FLOW FILTRATION SYSTEM.
9. Van Reis R.M., et al., Patente estadounidense N.º: 6.054.051, TANGENTIAL-FLOW FILTRATION SYSTEM.
10. Van Reis R.M., et al., Patente estadounidense N.º: 5.490.937, TANGENTIAL FLOW FILTRATION PROCESS AND APPARATUS.
11. Van Reis R.M., et al., Patente estadounidense N.º: 5.256.294, TANGENTIAL FLOW FILTRATION PROCESS AND APPARATUS.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para separar una proteína de interés de una corriente de alimentación que comprende leche de un mamífero transgénico, mediante un proceso de filtración en profundidad que separa una proteína de interés de dicha corriente de alimentación en función del tamaño de las partículas, donde el contenido de leche se combina 1:1 con sulfato de amonio 3,8M antes de llevar a cabo la filtración en profundidad.
2. El método de la reivindicación 1, donde el proceso de filtración en profundidad comprende una matriz de filtración capaz de atrapar partículas en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 micrones.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, donde el proceso de filtración en profundidad comprende una matriz de filtración capaz de atrapar partículas en el rango de 5 a 50 micrones.
4. El método de la reivindicación 1, donde las proteínas caseína de la leche se disocian del resto de la corriente de alimentación por medio del contacto con EDTA.
5. El método de la reivindicación 1, donde la proteína de interés tiene un peso molecular de entre 1 y 1000kDa.
- 15 6. El método de la reivindicación 1, donde dicha corriente de alimentación se diluye antes de la filtración en profundidad.
7. El método de la reivindicación 1, donde la proteína de interés es bioactiva.
8. El método de la reivindicación 1, donde el proceso de filtración en profundidad se lleva a cabo a un pH por encima de aquel en que la proteína de interés no precipita.
- 20 9. El método de la reivindicación 1, que comprende además una etapa de fraccionamiento que utiliza una membrana de filtración de celulosa.
10. El método de la reivindicación 1, que comprende además una etapa de cromatografía catiónica después de la etapa de filtración.
- 25 11. El método de la reivindicación 1, que comprende además una etapa de cromatografía de exclusión por tamaños después de la etapa de filtración.
12. El método de la reivindicación 1, que comprende además una etapa de cromatografía en fase inversa después de la etapa de filtración.
13. El método de la reivindicación 1, donde el proceso de filtración en profundidad se lleva a cabo a un flujo de permeación de menos de 30 l/mh.
- 30 14. El método de la reivindicación 1, donde la corriente de alimentación concentración tiene de 0,5 partes a 3 partes leche natural.
15. El método de la reivindicación 1, donde el proceso de filtración en profundidad se lleva a cabo al pH isoelectrico de la proteína de interés.

### Clarificación de rhAT Utilizando filtración en profundidad

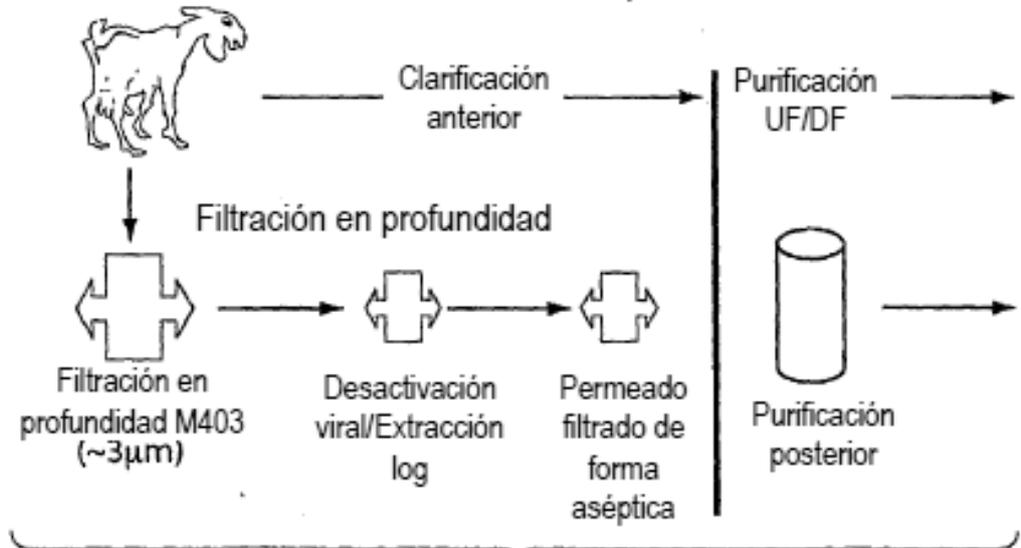


Fig. 1

Rendimiento volumétrico con respecto a resistencia

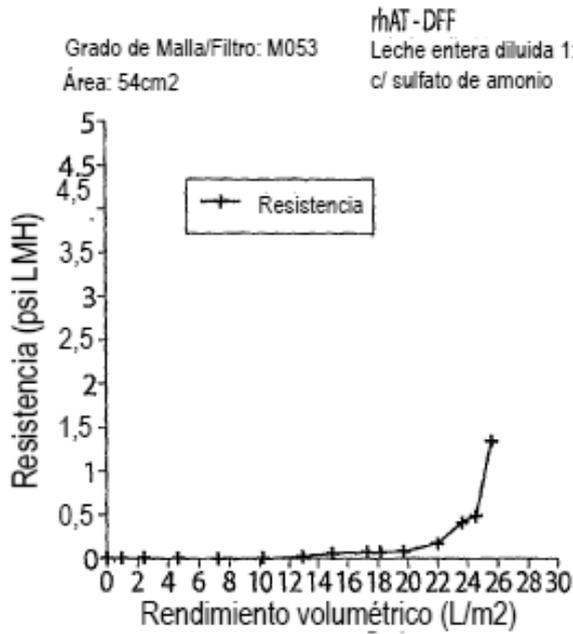


Fig. 2A

Rendimiento volumétrico con respecto a resistencia

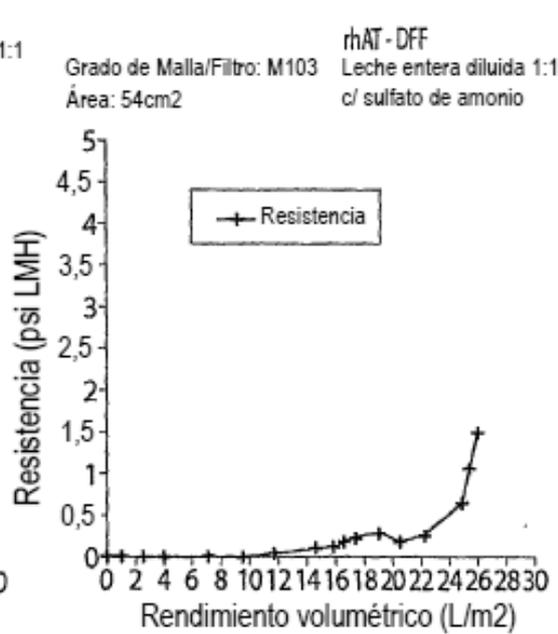


Fig. 2B

Rendimiento volumétrico con respecto a resistencia

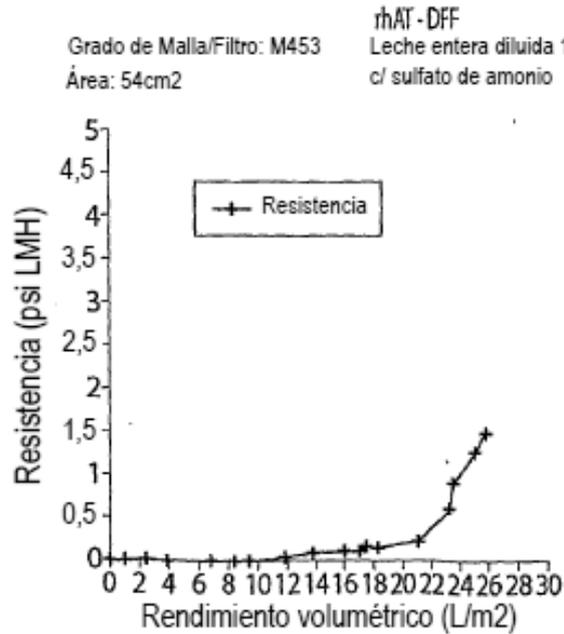


Fig. 2C

Rendimiento volumétrico con respecto a resistencia

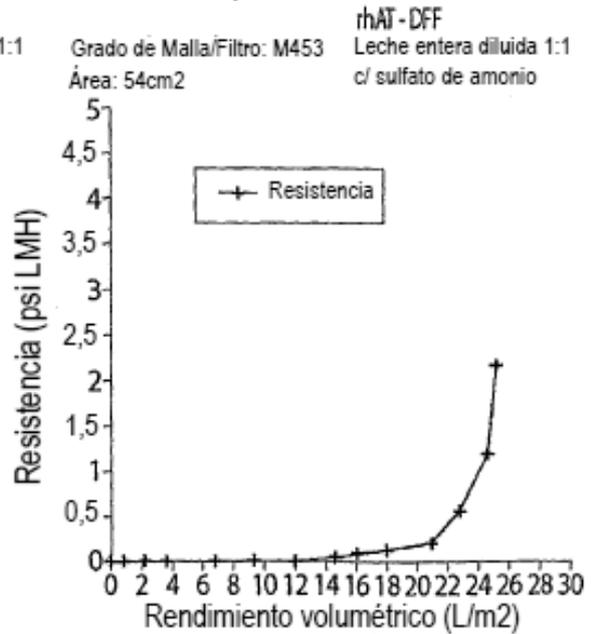
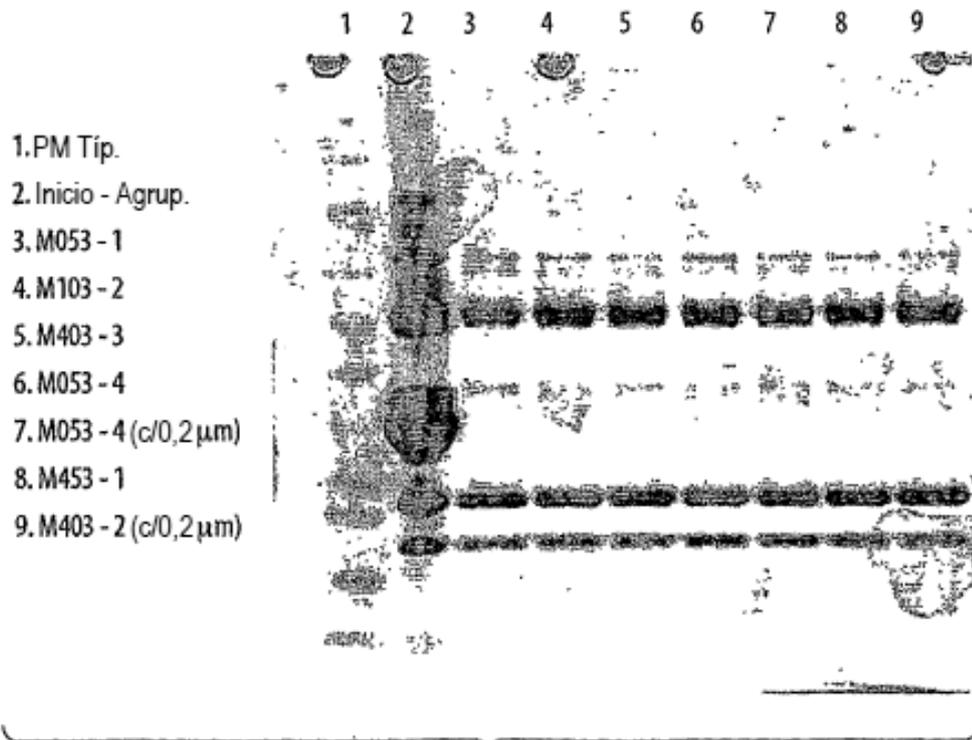


Fig. 2D

**Matriz de DFF de rhAT**  
N.R. SDS PAGE



**Filtración en profundidad de  
rhAT**

1. PM Típ.
2. Permeado 500K
3. Elu. Hep.
4. Permeado filtración en profundidad A. S.
5. F.T. Hep.
6. Lavado Hep.
7. Elución Hep. 1h
8. TFF Pall 0,1µm
9. F.T. Hep.
10. Lavado Hep.
11. Elución Hep. 1h

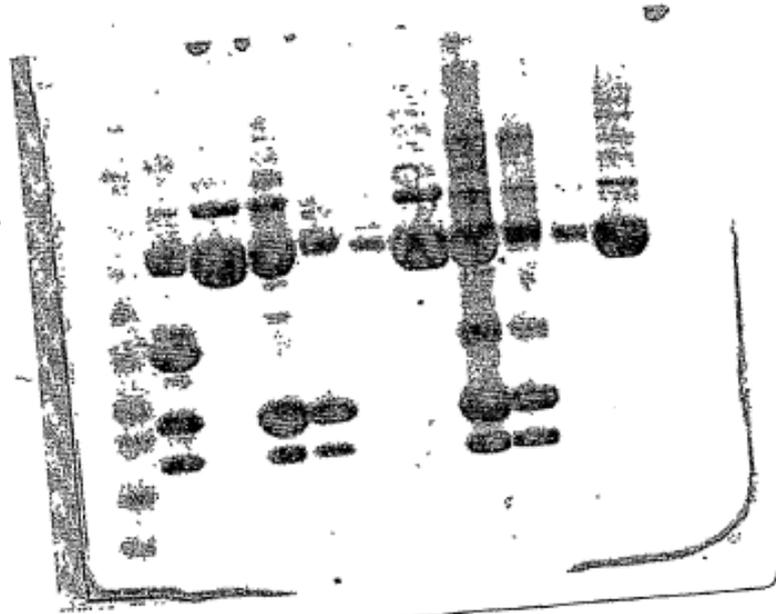


Fig. 4

*Diagrama de flujo del proceso de filtración*

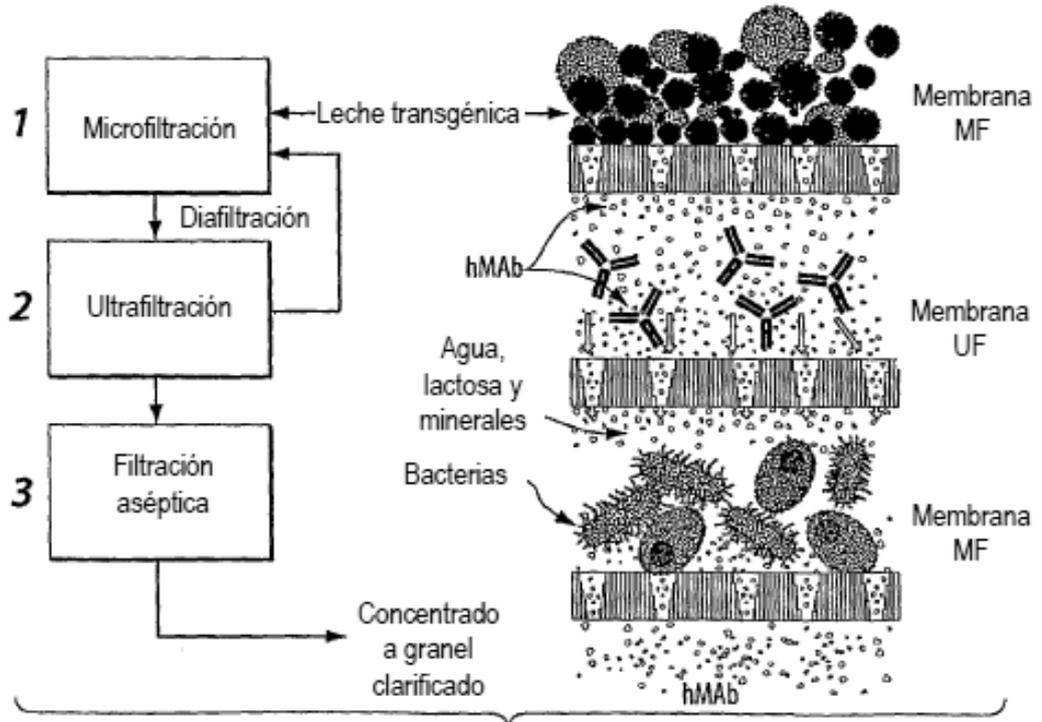


Fig. 5

## Proceso transgénico

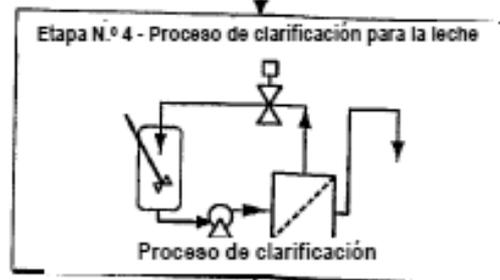
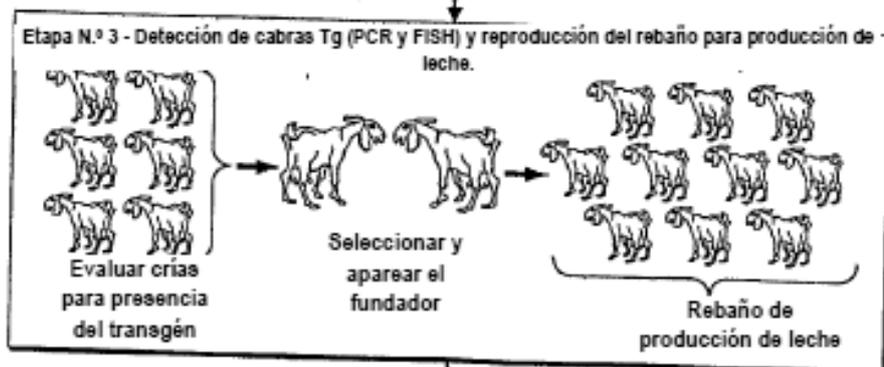
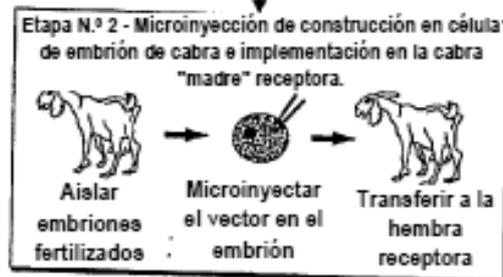
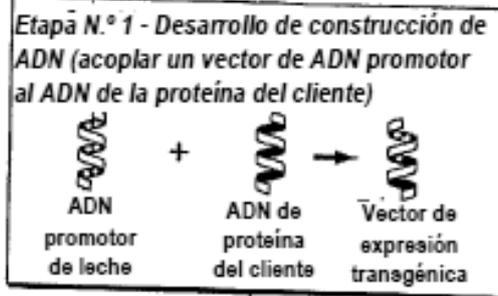


Fig. 6

*Diagrama de sistema DF*

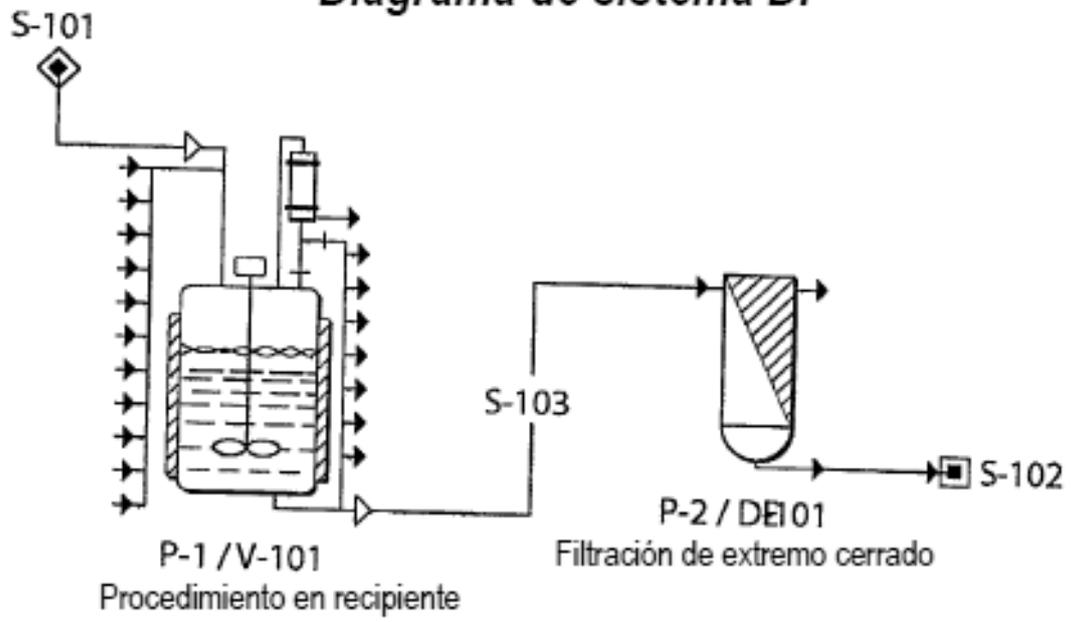


Fig. 7

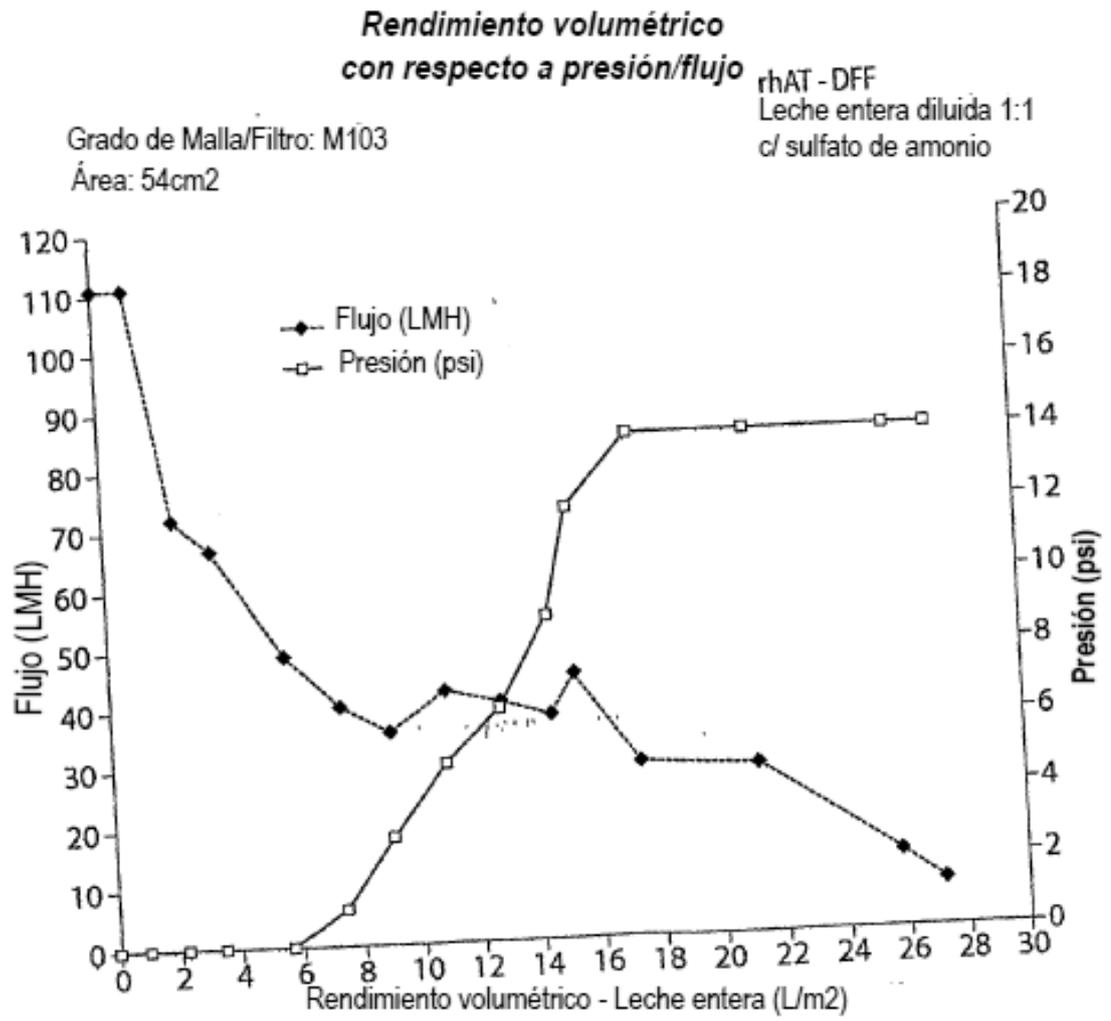


Fig. 8

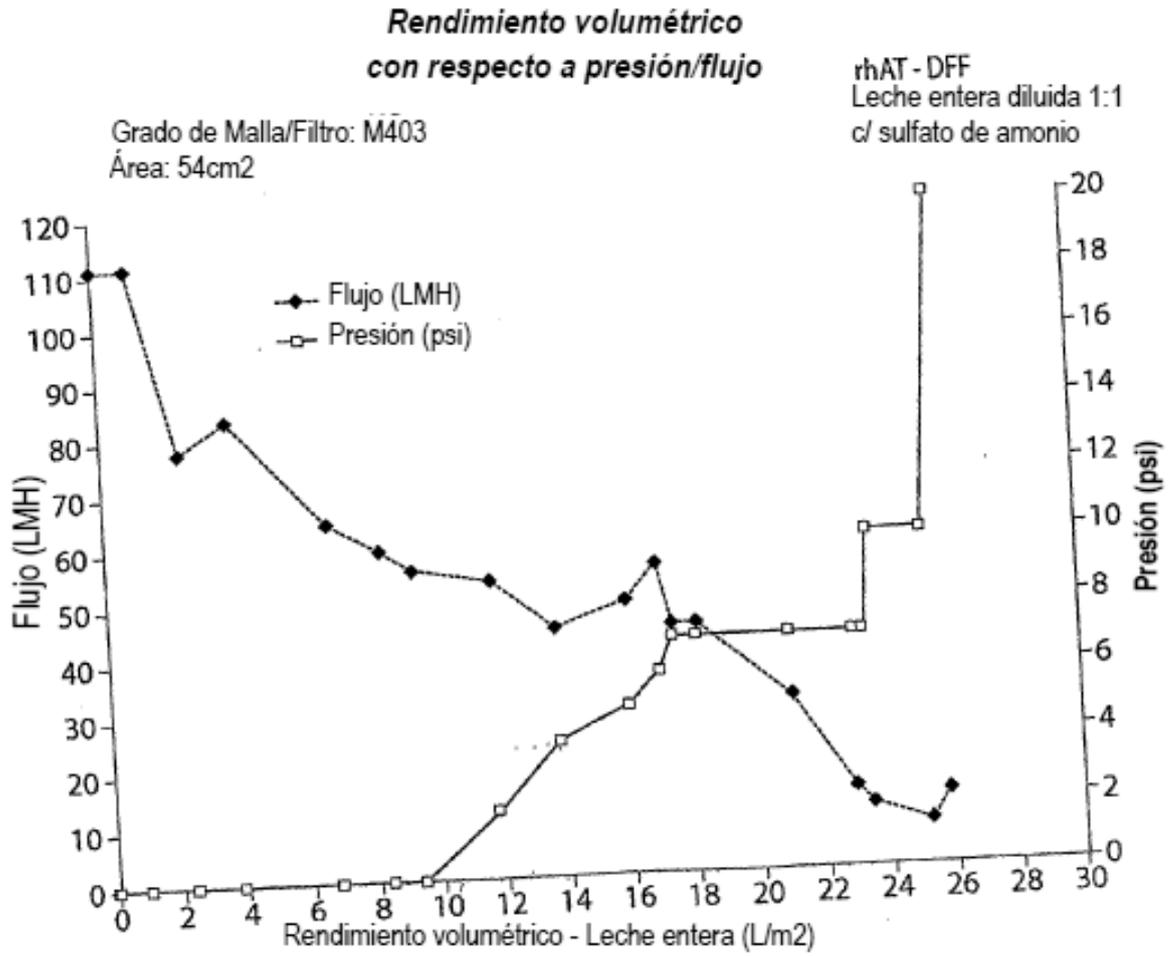


Fig. 9

## Filtración en profundidad de rhAT

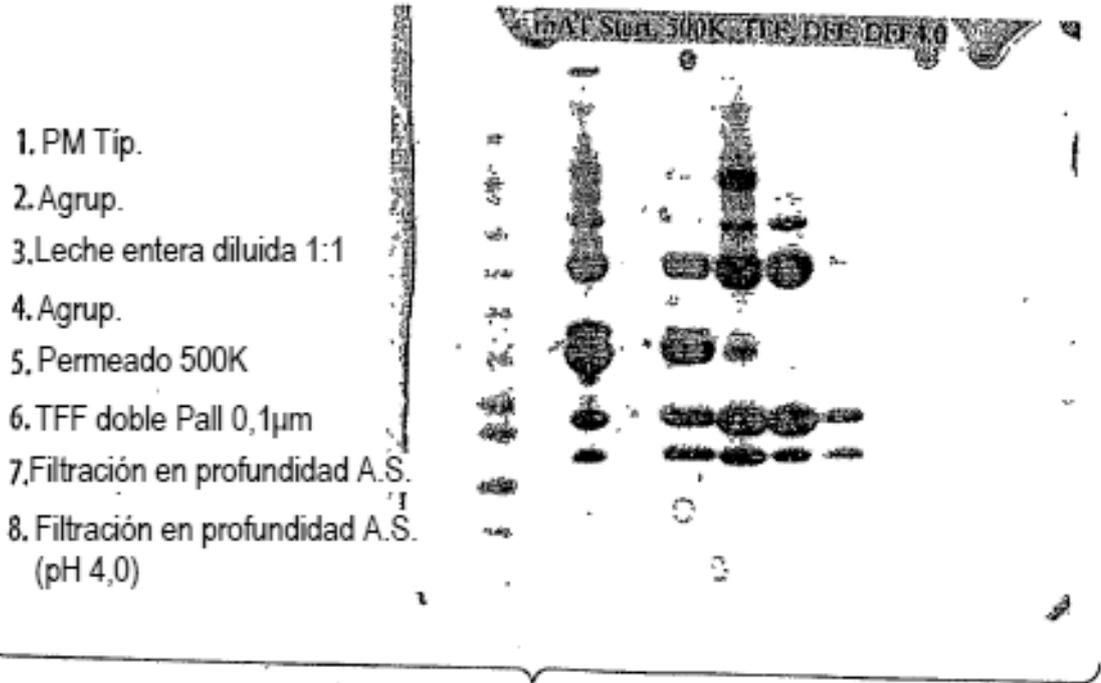


Fig. 10

## *Filtración en profundidad de rhAT*

1. PM Típ.
2. Permeado 500K
3. Elu. Hep.
4. Filtración en profundidad  
(Testigo - 4C)
5. F.T. Hep.
6. Lavado Hep.
7. Elución Hep. 2h
8. Filtración en profundidad (10h  
- 60C)
9. F.T. Hep.
10. Lavado Hep.
11. Elución Hep. 3h



Fig. 11

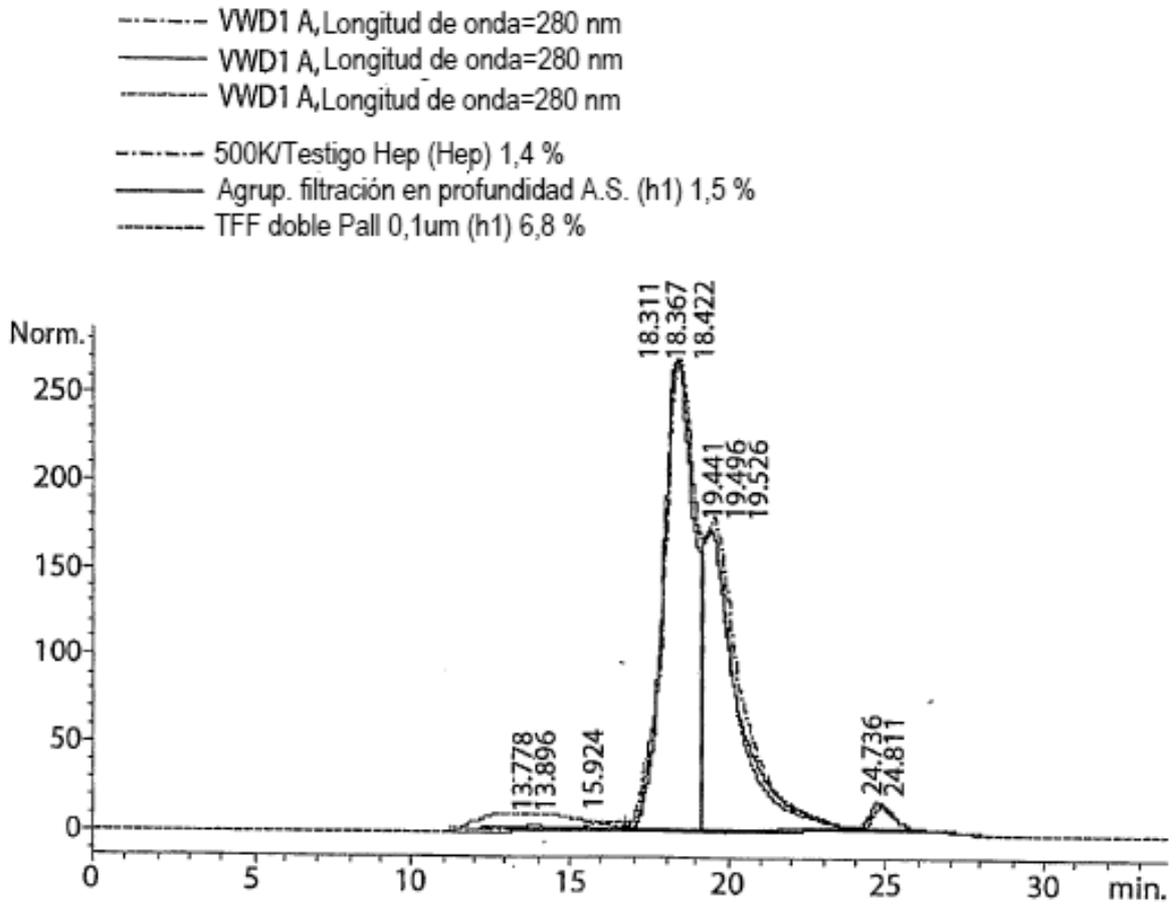


Fig. 12A

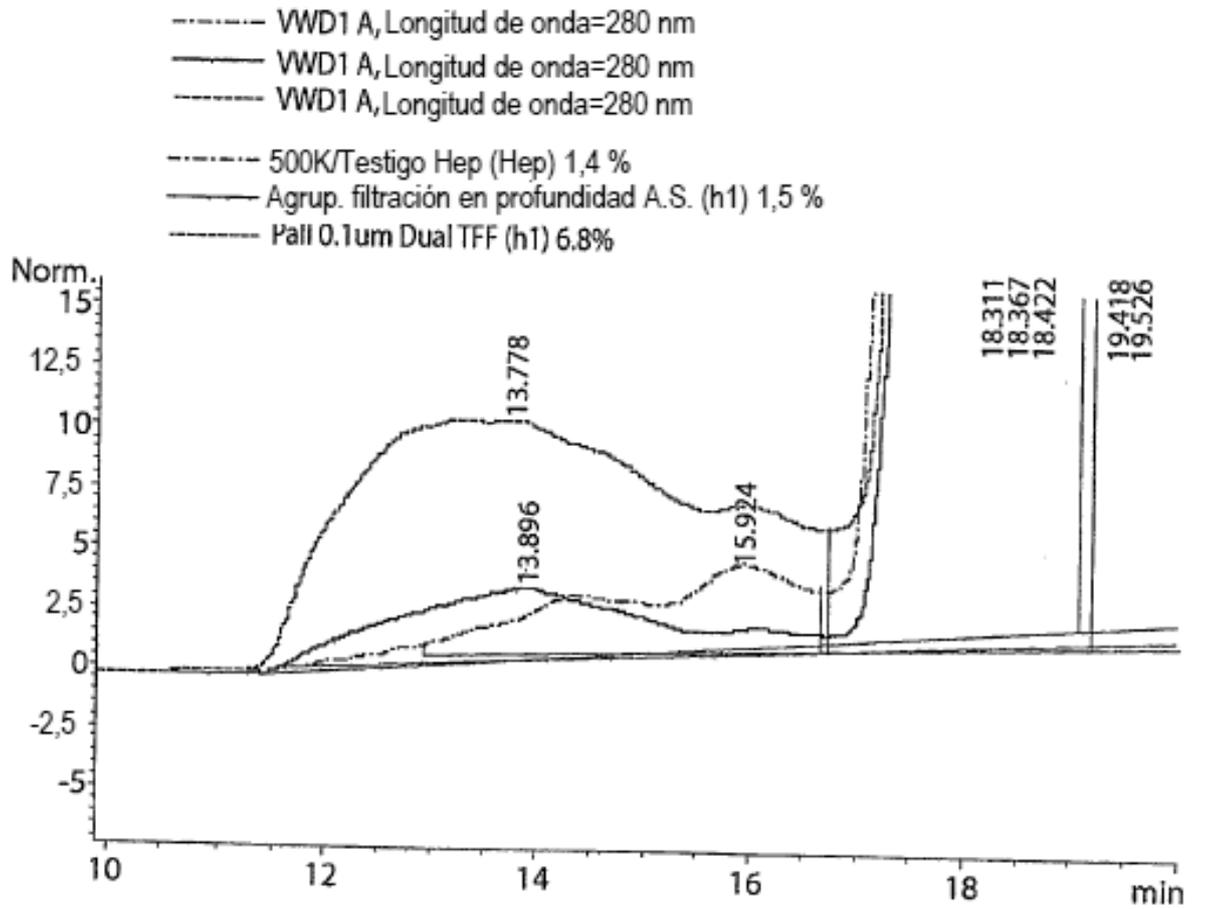


Fig. 12B

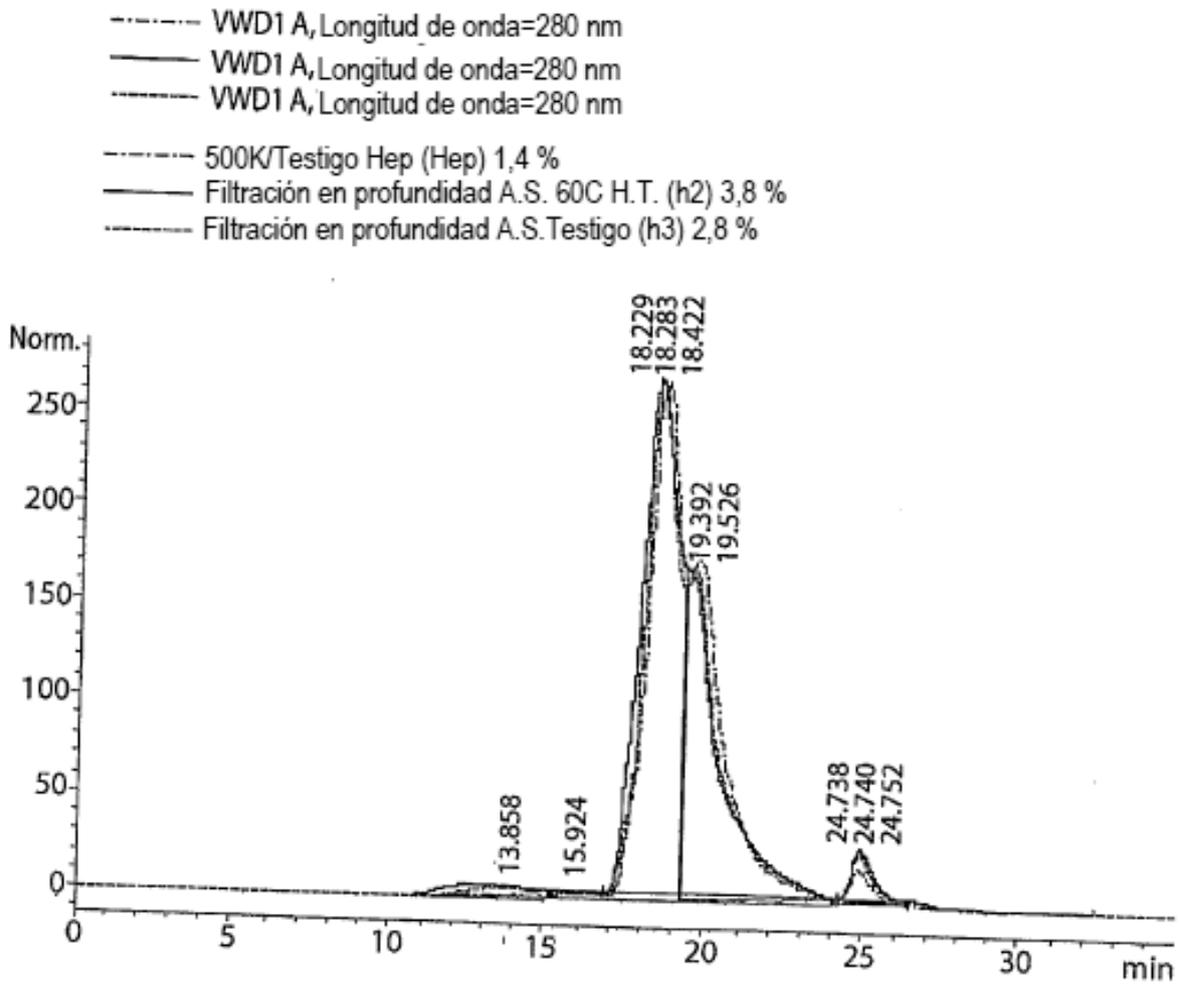


Fig. 13

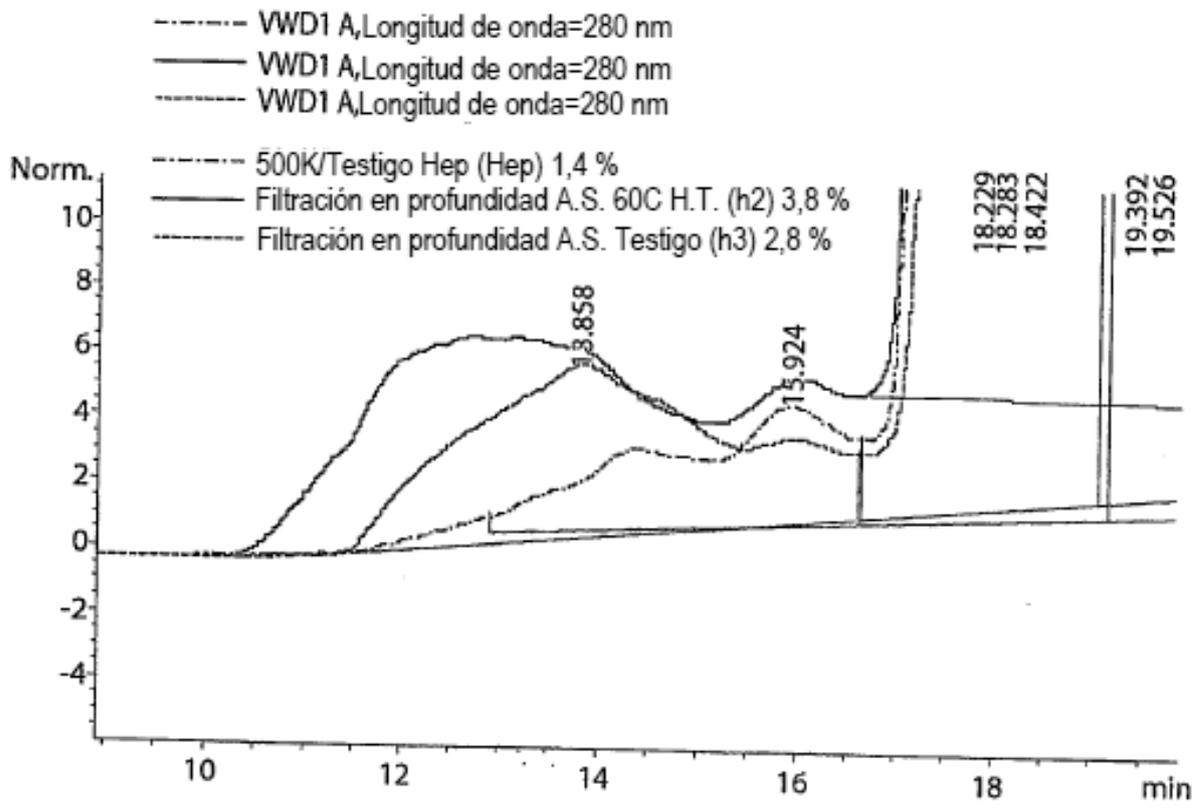


Fig. 14