

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 323**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)	<b>B07B 11/06</b>	(2006.01)
<b>B01D 61/00</b>	(2006.01)	<b>C07K 1/34</b>	(2006.01)
<b>B01D 61/02</b>	(2006.01)		
<b>B01D 61/08</b>	(2006.01)		
<b>B01D 61/14</b>	(2006.01)		
<b>B01D 15/00</b>	(2006.01)		
<b>B01D 15/04</b>	(2006.01)		
<b>B07B 7/00</b>	(2006.01)		
<b>B07B 7/02</b>	(2006.01)		
<b>B07B 11/04</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2005 E 12179336 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2550971**

54 Título: **Dispositivos y procedimientos para la fabricación 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:

**27.09.2017**

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)  
100 Bayer Boulevard, PO Box 915  
Whippany, NJ 07981, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 634 323 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 procedimientos para la fabricación continua integrada de moléculas biológicas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento y sistema mejorados para purificar una molécula de interés a partir de una mezcla heterogénea de moléculas. Más particularmente, la presente invención se refiere a procedimientos para la purificación de una proteína de interés en una corriente de alimentación de fluido de cultivo tisular a partir de un procedimiento de fermentación de perfusión continua.

**Antecedentes de la invención**

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

20 La figura 1 muestra un esquema de un típico procedimiento de aislamiento del estado de la técnica de la fermentación de perfusión continua, ya que es bien conocido por los expertos en la materia. El sistema de fermentación de perfusión continua comprende un dispositivo de retención celular (1), que mantiene la mayoría de las células que producen el producto en el sistema de fermentación. Una corriente de cosecha continua desde el sistema de perfusión continua, que contiene todavía algunas células, restos y otras partículas, se bombea mediante una bomba de cosecha (2) en grandes vasos de recogida (3), tales como depósitos de acero inoxidable. Estos vasos de almacenamiento de cosecha por lo general tienen que enfriarse con el fin de mantener las pérdidas de producto causadas por la degradación dentro de unos valores factibles.

25 Una vez que se ha recogido un volumen especificado, que es típicamente después de 1-4 días o más, los vasos de recogida de la cosecha se desconectan del vaso de fermentación estéril y el material recogido se designa como un lote de cosecha. La siguiente etapa es eliminar células, restos y partículas (etapa 2). A escala industrial, esto se realiza normalmente usando centrifugación (4), seguida de filtración de membrana frontal (5), o mediante filtración profunda frontal (6), seguido de filtración de membrana frontal (7). Otra técnica utilizada a veces es la microfiltración de flujo tangencial (o "de flujo cruzado"). En cualquier caso, el producto del procedimiento de eliminación de partículas es un lote de fluido de cultivo tisular clarificado, o FCTc (8). Más detalles sobre la separación de partículas para productos biotecnológicos se pueden encontrar en libros de texto estándar, tales como Biotechnology, Vol. 3, Bioprocessing, Wiley-VCH, 2ª edición (1996), ISBN: 3527283137.

35 En la siguiente etapa (etapa 3), el lote de fluido de cultivo tisular clarificado se procesa adicionalmente para concentrar y, si es posible, purificar el producto. Esto normalmente se realiza mediante ultrafiltración de flujo cruzado o por cromatografía de lecho relleno.

40 En el caso de la ultrafiltración de flujo cruzado, el FCTc se bombea en el depósito de reciclado (9) del sistema. Se utiliza una bomba (10) para empujar el material a través de un ultrafiltro de flujo cruzado. El producto queda retenido por la membrana y se recicla como material retenido al depósito de reciclaje, mientras que el agua y los contaminantes más pequeños son empujados a través de la membrana en el permeado (11) debido a la presión transmembrana generada por la disminución de presión en el módulo de ultrafiltración. En cada paso a través del filtro, el FCTc, por lo tanto, se vuelve más concentrado y el volumen de FCTc total se reduce hasta que se alcanza un factor de concentración deseado. Una vez que se alcanza el factor de concentración deseado, el procedimiento 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 productos biotecnológicos se pueden encontrar en libros de texto estándar, tales como Biotechnology, Vol. 3, Bioprocessing, Wiley-VCH, 2ª edición (1996), ISBN: 3527283137.

50 En el caso de la cromatografía de lecho relleno, el FCTc se bombea sobre una columna de cromatografía (12) que contiene un lecho de resina compacta. El producto se une a la resina y luego se eluye de forma generalmente concentrada y purificada (aislado, 13) utilizando un tampón de elución (14) adecuado, después de lo cual se limpia la columna y se regenera usando tampones y soluciones de limpieza (14) adecuados.

55 Otras variantes de cromatografía que se han propuesto para la concentración/purificación de FCTc son cromatografía de lecho expandido y cromatografía de membrana. La cromatografía de lecho expandido puede procesar soluciones de que contienen partículas. Sin embargo, aún se requiere la filtración del aislado después de la cromatografía, aunque se reducen las zonas de filtración. La cromatografía de membrana utiliza pilas de membranas de microfiltración modificadas en vez de lechos de resina compacta. La ventaja es que la transferencia de masa es, en gran parte, por convección en vez de por difusión, que permite una separación más rápida. Por lo demás, el

procedimiento es típicamente equivalente a la cromatografía de lecho relleno estándar. Más detalles sobre la cromatografía para la concentración y purificación de productos biotecnológicos se pueden encontrar en libros de texto estándar, tales como Protein Purification, Principles, High-Resolution Methods, and Applications, Wiley-VCH, 2. Edition (1998), ISBN 0-471-18626-0.

- 5 A menudo, el grueso del aislado se congela a continuación y se almacena para su uso posterior en otras etapas de purificación aguas abajo.

Por tanto, como se ha descrito anteriormente, el procedimiento de aislamiento tras la fermentación de perfusión continua es generalmente un procedimiento discontinuo y está, física y logísticamente, separado del procedimiento continuo aguas arriba. Asimismo, mientras que la fermentación ha de realizarse en esterilidad, el aislamiento (es decir, la eliminación de partículas y la concentración/purificación) se realiza esencialmente en condiciones de limpieza, pero no estériles.

Los procedimientos del estado de la técnica como los descritos anteriormente tienen una serie de problemas:

15 P1. Pérdidas de rendimiento y potencial reducción de la calidad debido al elevado tiempo de residencia del producto. La cosecha de la fermentación de perfusión continua tiene que recogerse y almacenarse durante períodos de tiempo significativos, como se ha descrito anteriormente, antes de que se pueda procesar un lote de aislamiento. La cosecha recogida, aunque enfriada, todavía proporciona un medio perjudicial para los productos proteicos complejos e inherentemente inestables. Por lo tanto, se producen pérdidas significativas de productos, lo que reduce la capacidad de la planta y aumenta el coste de los productos. Por otra parte, la calidad del producto puede verse afectada negativamente.

20 P2. Se requieren instalaciones con cuartos fríos o vasos refrigerados grandes para el almacenamiento intermedio de grandes volúmenes de cosecha, lo que conduce a elevados costes de capital y anulan la ventaja citada de capacidad y movilidad de los fermentadores de perfusión.

25 P3. Las tecnologías de concentración/purificación convencionales (por ejemplo, ultrafiltración, cromatografía de lecho relleno) tienen un rendimiento volumétrico relativamente bajo, tiempos de respuesta significativos y son relativamente laboriosos. Como resultado, por lo general no se realizan más de 1 procedimiento discontinuo al día.

30 P4. Por otra parte, los procedimientos y procedimientos de aislamiento actuales tienen dificultades logísticas para tratar con los variables volúmenes del procedimiento en plantas de fermentación que implican más de un fermentador. En las plantas de perfusión continua a gran escala, un número variable de fermentadores son operativos.

P5. Además, los procedimientos de aislamiento del estado de la técnica se efectúan en condiciones de limpieza, pero no pueden ser manejados en esterilidad. Esto a menudo conduce a un número significativo de lotes rechazados debido a problemas con la carga microbiana.

35 P6. La utilización de materiales desechables, tales como filtros, ensamblajes, bolsas etc. desechables, aunque muy deseables en la producción de productos parenterales humanos (por ejemplo, para evitar la limpieza y validación de la limpieza y otros aspectos) es muy costosa y, de hecho, a menudo no es económico.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento de separación de proteínas integrado y continuo que es capaz de funcionar durante períodos prolongados de tiempo en condiciones de esterilidad.

#### 40 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo aparato y procedimiento para purificar moléculas a partir de una mezcla de fluidos heterogénea. Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento para purificar una molécula de interés a partir de una mezcla de fluidos clarificada heterogénea de la que se han eliminado los contaminantes particulados. El procedimiento comprende la etapa de filtración de una mezcla de fluidos clarificada heterogénea mediante ultrafiltración continua a un caudal específico por debajo del punto de transición de la molécula de interés en la región dependiente de la presión de la curva del flujo frente a la PTM, en la que el caudal específico se mantiene sustancialmente constante durante toda la ultrafiltración continua.

En realizaciones particulares, el procedimiento de la invención comprende filtrar la mezcla de fluidos clarificada a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados aproximadamente igual a entre 0,1 y 2 veces el caudal volumétrico de la mezcla de fluidos clarificada en litros/hora. En realizaciones particulares, el procedimiento de la invención comprende filtrar la mezcla de fluidos clarificada a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados aproximadamente igual a entre 0,3 y 1 veces el caudal volumétrico de la mezcla de fluidos clarificada en litros/hora.

El procedimiento de la invención permite ventajosamente filtrar la mezcla clarificada a un caudal específico que produce una concentración de la pared de menos de aproximadamente 20 %, menos de 15 % o menos del 10 % mayor que la concentración de la fracción retenida, sin polarización apreciable de la concentración.

5 En una realización más específica, la invención se refiere a un procedimiento integrado, continuo y estéril para la fermentación de perfusión continua, la eliminación de partículas y la purificación/concentración. En un aspecto de la invención, el procedimiento comprende filtrar la mezcla de cultivo tisular mediante un procedimiento de separación que separa selectivamente la proteína de interés de la mezcla en un punto de ajuste operativo por debajo del punto de transición de la proteína en la región dependiente de la presión de la curva del flujo frente al PTM para producir un aislado de producto concentrado, sin partículas y parcialmente purificado, en el que el caudal específico a través del procedimiento de separación se mantiene sustancialmente constante a un nivel menor que el punto de transición de la proteína.

En otro aspecto de la invención, el procedimiento es un procedimiento continuo para la purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla de fluido de cultivo tisular heterogénea, que comprende:

- 15 (a) producir mediante un procedimiento de fermentación de perfusión continua una mezcla de fluidos de cultivo tisular heterogénea que contiene una proteína de interés;
- (b) transferir la mezcla de fluidos de cultivo tisular a un procedimiento de eliminación de partículas continuo integrado con el procedimiento de fermentación de perfusión continua;
- (c) eliminar los contaminantes particulados del fluido de cultivo tisular en el procedimiento de eliminación de partículas continuo para producir un fluido de cultivo tisular clarificado que contiene la proteína de interés;
- 20 (d) transferir el fluido de cultivo tisular clarificado a un procedimiento de purificación continuo integrado con el procedimiento de eliminación de partículas continuo; y
- (e) purificar la proteína de interés a partir del fluido de cultivo tisular clarificado en el procedimiento de purificación continuo;
- 25 en el que el caudal específico de la mezcla a través del procedimiento de fermentación de perfusión continua, el procedimiento de eliminación de partículas continuo y el procedimiento de purificación continuo se mantiene sustancialmente constante.

En aún otro aspecto de la invención, el procedimiento es un procedimiento semicontinuo para la purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla de fluido de cultivo tisular heterogénea, que comprende:

- 30 (a) producir mediante un procedimiento de perfusión de fermentación continua una mezcla de fluidos de cultivo tisular heterogénea que contiene una proteína de interés;
- (b) transferir la mezcla de fluidos de cultivo tisular a un procedimiento de eliminación de partículas continuo integrado con el sistema de fermentación de perfusión continua;
- (c) eliminar los contaminantes particulados del fluido de cultivo tisular en el procedimiento de eliminación de partículas continuo para producir un fluido de cultivo tisular clarificado que contiene la proteína de interés;
- 35 (d) transferir el fluido de cultivo tisular clarificado a un vaso de compensación integrado con el procedimiento de eliminación de partículas continuo;
- (e) transferir de forma intermitente el fluido de cultivo tisular clarificado a un procedimiento de purificación integrado con el vaso de compensación; y
- 40 (f) purificar la proteína de interés a partir del fluido de cultivo tisular clarificado en el procedimiento de purificación para producir un aislado de producto sin partículas, concentrado, parcialmente purificado y estéril que contiene la proteína de interés;
- en el que el caudal específico de la mezcla a través del procedimiento de fermentación de perfusión continua y el procedimiento de eliminación de partículas continuo se mantiene sustancialmente constante.

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

50 En otro aspecto de la invención, el aparato comprende: (a) a un sistema de fermentación de perfusión continua; (b) un sistema de eliminación de partículas continuo integrado con el sistema de fermentación de perfusión; y (c) un sistema de purificación intermitente integrado con el sistema de eliminación de partículas, en el que el aparato está adaptado para mantener las condiciones estériles.

55 El sistema de purificación puede ser, por ejemplo, un sistema de ultrafiltración o un sistema de adsorción/desorción por convección o cualquier otro sistema capaz de purificar o purificar parcialmente una proteína de interés a partir de una mezcla heterogénea en un sistema integrado, continuo o semicontinuo, estéril, como se describe en el presente documento.

El procedimiento y aparato de la invención están adaptados para permitir el procesamiento continuo de una mezcla de fluidos heterogénea, tal como un fluido de cultivo celular, a un caudal sustancialmente constante. En un aspecto

particular de la invención, el procedimiento y aparato de la invención están adaptados para permitir el procesamiento continuo de una mezcla heterogénea de fluidos de cultivo celular o tisular a un caudal sustancialmente constante por debajo del punto de transición de la proteína en la región dependiente de la presión de la curva del flujo frente al PTM durante un período continuo y durante todo el procedimiento de purificación.

- 5 Estos y otros aspectos de la invención se describen con detalle a continuación en la siguiente descripción detallada de la invención.

### **Breve descripción de los dibujos**

Los dibujos adjuntos 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.

- 10 FIG. 1: esquema de un procedimiento de perfusión continua convencional seguido de 3 etapas del procedimiento de aislamiento segregadas física y logísticamente (recolección de la cosecha por lotes, eliminación de partículas discontinua y concentración/purificación discontinua).
- 15 FIG. 2: Representación esquemática de 2 realizaciones del dispositivo A de invención para la fabricación continua, integrada y estéril. Esquema de la realización de A1 mostrada en el lado izquierdo y esquema de la realización A2 mostrado en el lado derecho.
- FIG. 3: Representación esquemática de 2 realizaciones del dispositivo B de invención para la fabricación continua, integrada y estéril. Esquema de la realización de B1 mostrada en el lado izquierdo y esquema de la realización B2 mostrado en el lado derecho.
- 20 FIG. 4: Esquema de una realización del sistema de eliminación de partículas continuo e integrado (100) de la invención, un elemento del dispositivo A de la invención y del dispositivo B de la invención.
- FIG. 5: representaciones esquemáticas de realizaciones adicionales de dispositivo A de la invención que combinan múltiples elementos para aumentar la capacidad global de la planta (A3) o el rendimiento de concentración y separación (A4).
- 25 FIG. 6: representaciones esquemáticas de realizaciones adicionales de dispositivo B de la invención.
- FIG. 7: realización adicional de dispositivos de la invención que combina los elementos del dispositivo A y del dispositivo B en serie para aumentar el rendimiento global de la concentración y la separación.
- FIG. 8: ejemplo comparativo de las capacidades de carga total por 10" de cápsula de filtro para el procedimiento por lotes convencional y el dispositivo de la realización de la invención para la eliminación continua de partículas (procedimiento de filtración continuo integrado) utilizando cápsulas de filtro comerciales idénticas. Se muestra un procedimiento de ejemplo de producción del Factor VIII de la coagulación sanguínea.
- 30 FIG. 9: Ejemplo de curva de presión-flujo (flujo del permeado específico en LMH= litros/hora/m<sup>2</sup> sobre la presión transmembrana) y determinación del punto de operación. El círculo muestra el punto de operación típica que se ajustará a través de la PTM para procedimientos discontinuos convencionales. El rectángulo muestra la región de funcionamiento preferida que se ajustará a través de la bomba de permeado según el procedimiento de uso del dispositivo A de la invención.
- 35 FIG. 10: Ejemplo de distribución del tiempo de residencia y el tiempo de residencia medio del sistema de UF continua integrado (300) según el procedimiento de uso del dispositivo A de la invención. Medido para el sistema continuo desechable con el módulo de 290 cm<sup>2</sup> (62,5 cm de longitud), 120 LMH de flujo cruzado, 0,2 LMH de flujo de la fracción retenida, 2 LMH de flujo del permeado.
- 40 FIG. 11: Ejemplo de aislamiento del rFVIII a partir de fermentación de perfusión continua libre de proteínas plasmáticas usando una realización del dispositivo A de la invención. Comparación del rendimiento de aislamiento promedio del procedimiento continuo de la invención en comparación con el rendimiento promedio del aislamiento discontinuo, incluida una desviación estándar. Se usaron 3 lotes consecutivos para determinar el rendimiento del lote, mientras que se usaron 3 puntos consecutivos (días) para el procedimiento continuo.
- 45 FIG. 12: Ejemplos del rendimiento del dispositivo A de la invención. Presión transmembrana y flujo específico del sistema de ultrafiltración continuo integrado (300) como una función del tiempo de procedimiento continuo para 3 ejemplos diferentes mostrados. Triángulos = membrana de 100 kDa, factor VIII de coagulación sanguínea recombinante (rFVIII); cuadrados = membrana de 10 kDa, interleucina-2 recombinante; círculos = membrana de 50 kDa, glicoproteína de ingeniería genética (Mr > 100 kDa). Todos los ejemplos mostrados son de fermentación de perfusión continua libre de proteínas plasmáticas.
- 50 FIG. 13: Ejemplo de rendimiento a largo plazo del dispositivo A de la invención acoplado directamente a la fermentación de perfusión continua de la línea celular que coexpresa 2 productos proteicos (proteína fluorescente verde GFP e IL-2SA). Presión transmembrana y flujo específico del sistema de ultrafiltración (300) continuo de la invención como una función del tiempo de procedimiento continuo mostrado. Se usó una membrana de 10 kDa.
- 55 FIG. 14: Ejemplo de rendimiento a largo plazo del dispositivo A de la invención acoplado directamente a la fermentación de perfusión continua de la línea celular que coexpresa 2 productos proteicos (proteína fluorescente verde GFP e IL-2SA). Se usó una membrana de 10 kDa. Factor de concentración de ambos productos proteicos, como se determina mediante ensayos específicos y factor de concentración volumétrica se muestran como una función del tiempo de procedimiento continuo.
- 60 FIG. 15: Ejemplo del desempeño del dispositivo B de la invención. Rendimiento y descenso de la presión en cerca de 100 ciclos de adsorción/desorción consecutivos con adsorbente de convección (proteína diana: variante del factor FVIII de la coagulación sanguínea modificado genéticamente; adsorbente de convección: adsorbente

comercial, Mustang Q, Pall Corporation).

FIG. 16: Ejemplo de desempeño del dispositivo B de la invención. Perfil UV y de conductividad durante un ciclo de adsorción/desorción típico con adsorbente de convección (proteína diana: variante del factor FVIII de la coagulación sanguínea modificado genéticamente; adsorbente de convección: adsorbente comercial, Mustang Q, Pall Corporation).

FIG. 17: Ejemplo de desempeño del dispositivo B de la invención. Gel de SDS-PAGE (teñido con plata) de la carga= cosecha clarificada que sale de forma continua del sistema de eliminación de partículas (100) y cargado de forma semicontinua sobre el sistema adsorbente conectivo (400) y eluato de adsorción/desorción típico mostrados. Proteína diana: variante del factor FVIII de la coagulación sanguínea modificado genéticamente; adsorbente de convección: adsorbente comercial, Mustang Q, Pall Corporation). El eluato se diluyó de nuevo a la concentración de carga antes de la carrera en el gel.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

Excepto como se define expresamente en el presente documento, la terminología utilizada en esta aplicación es estándar en la técnica. Las siguientes definiciones de ciertos términos se proporcionan en el presente documento para asegurar la claridad y capacidad de definición al significado de las reivindicaciones.

Las unidades, prefijos y símbolos pueden indicarse en su forma aceptada del SI. Los intervalos numéricos citados en el presente documento incluyen los números que definen el intervalo e incluyen y apoyan cada número entero dentro del intervalo definido. A menos que se indique lo contrario, los términos "un/uno" o "una" se han de interpretar en el sentido de "al menos uno de". Los títulos de las secciones usadas en el presente documento son sólo para propósitos de organización y no deben interpretarse como una limitación del objeto descrito.

El término "**clarificación**" y "**clarificado**" significa la eliminación de materia particulada a partir de una solución para que la solución restante pase a través de una membrana de 0,2 µm.

La expresión "**fermentación de perfusión continua**" se refiere a un sistema de fermentación en estado estacionario o procedimiento que funciona sin interrupción y en el que las células o los microorganismos se mantienen en cultivo en fase de crecimiento exponencial mediante la adición continua de medio fresco que se equilibra mediante la eliminación de la suspensión de células del biorreactor.

Los términos "**cultivar**", "**cultivo**", "**crecimiento**", "**mantener**", "**soportar**" y "**expandir**" son sinónimos en el sentido de que las células permanecen viables y capaces de producir progenie.

El término "**concentración**", en su forma de verbo, significa la eliminación de agua de una solución de forma que la cantidad de una molécula de interés por volumen de solución restante aumenta.

El término "**polarización de la concentración**" significa la acumulación de moléculas retenidas (capa de gel) en la superficie de la membrana causada por una combinación de factores: la presión transmembra, la velocidad del flujo cruzado, la viscosidad de la muestra y la concentración de soluto.

El término "**continuo**" significa secuencia y/o funcionamiento ininterrumpido en el tiempo durante períodos prolongados de tiempo. Tal como se utiliza en referencia a los procedimientos de fermentación, clarificación y filtración de la presente invención, "continuo" significa que los procedimientos están integrados físicamente y logísticamente a fin de permitir el funcionamiento sin interrupción durante un período prolongado de tiempo suficiente para producir un aislado de producto estéril, libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado que contiene la proteína de interés. El término continuo, tal como se utiliza en referencia a los procedimientos de la invención, también se entiende que significa que un procedimiento no se realiza de una manera discontinua o de una manera verdaderamente continua. Los procedimientos de la presente invención son capaces de un funcionamiento continuo, por ejemplo, durante períodos prolongados que van desde 1 día a varios meses sin interrumpir la operación o secuencia de los procedimientos. Tal como se utiliza en la presente invención, los procedimientos se ejecutan durante un período continuo mayor de 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.

Los términos "**semicontinuo**" e "**intermitente**" significan que uno o más procedimientos o elementos de un sistema integrado funcionan de una manera discontinua o por lotes, mientras que otros procedimientos o elementos del sistema integrado funcionan de una manera continua. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, el procedimiento de purificación es un/procedimiento de adsorción/desorción por convección, que normalmente requiere la adsorción de la mezcla heterogénea de un sustrato de adsorción, que, en última instancia, produce la saturación del sustrato, y que requiere la terminación del procedimiento de adsorción y desorción o la liberación de la fracción unida. Tal procedimiento es inherentemente intermitente, aunque capaz de integrarse con los procedimientos aguas arriba que son continuos.

El término "**adsorción/desorción por convección**" significa un procedimiento cromatográfico en el que la transferencia de masa se produce principalmente por convección. Adsorción/desorción por convección es un

procedimiento 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 la adsorción de una fracción a un sustrato seguido de la desorción de la fracción del sustrato.

5 El término "**flujo cruzado**" o "**flujo cruzado del fluido**" significa el flujo del fluido a través de la parte superior de la superficie de la membrana.

10 El término "**integrado**", como se usa en referencia a varios sistemas y/o procedimientos, significa que los sistemas y/o procedimientos están conectados física y lógicamente a fin de constituir un sistema unificado capaz de funcionar de forma continua. En el contexto del sistema de la presente invención, que se refiere a un sistema continuo o semicontinuo integrado para producir una proteína de interés libre de partículas concentrado y purificada parcialmente, un sistema integrado conectará diferentes componentes directamente y de una manera suficiente para mantener condiciones de esterilidad entre los diferentes componentes del sistema.

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.

15 El término "**mezcla**" se refiere a una combinación heterogénea de moléculas y compuestos que contienen una molécula de interés, tal como una proteína, y diversos contaminantes. Una mezcla preferida de la presente invención es un fluido de cultivo tisular compuesto por una mezcla heterogénea de proteínas que incluye una proteína exógena de interés, que se obtiene inicialmente a partir de un procedimiento de fermentación de perfusión continua.

20 El término "**capa de gel**" significa la capa microscópicamente fina de moléculas que se puede formar en la parte superior de una membrana. Puede afectar a la retención de las moléculas por obstrucción de la superficie de la membrana y reducir así el flujo del filtrado, o, en operación de flujo constante, aumentar la PTM.

25 El término "**molécula de interés**" significa partículas u otras especies de molécula que se han de separar de una solución 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 se ha de separar determinará el tamaño de poro de la membrana que se ha de usar. Preferiblemente, las moléculas de interés son de origen biológico o bioquímico o producidas mediante procedimientos transgénicos o *in vitro* e incluyen proteínas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Ejemplos de orígenes de corriente de alimentación preferentes incluyen el cultivo de células de mamífero y el cultivo de células de microorganismos, tales como bacterias, hongos y levaduras. También hay que señalar que las especies que se van a filtrar incluyen polipéptidos, proteínas, componentes celulares, ADN, coloides, micoplasma, endotoxinas, virus, carbohidratos y otras moléculas de interés biológico, glicosiladas o no, no deseados.

30 El término "**permeado**" se usa como sinónimo de filtrado.

35 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 conseguido mediante una ultrafiltración o procedimiento de adsorción/desorción por convección. Un aislado de producto no es necesariamente homogéneo, pero se purificará sustancialmente en relación con el grueso del producto inicial producido mediante el procedimiento de fermentación.

El término "**caudal específico**" se usa indistintamente con la expresión "flujo filtrado" en lo que se refiere al filtrado. El caudal de la fracción retenida específico es el caudal de la fracción retenida normalizada en el área de la membrana utilizada.

40 Tal como se utiliza en referencia al flujo, el término "**sustancialmente constante**" significa que el flujo se mantiene a un nivel generalmente constante durante un período sustancial durante el curso de la filtración.

45 El término "**fluido de cultivo tisular**" significa una mezcla heterogénea de componentes derivados de un medio de cultivo tisular. En aspectos preferidos de la invención, el fluido de cultivo tisular deriva de un procedimiento de fermentación de perfusión continua. Un fluido de cultivo tisular "clarificado" es un fluido de cultivo tisular que ha sido prefiltrado para eliminar los desechos celulares y otras macromoléculas grandes.

El término "**presión transmembrana**" y sus siglas "**PTM**" significan la presión promedio aplicada desde la alimentación al lado filtrado de la membrana. La PTM se calcula mediante  $PTM [bar] = [(PF + PR)/2] - Pf$ , en la que PF es la presión de alimentación, PR es la presión de la fracción retenida y Pf es la presión del filtrado.

50 El término "**recuperación**" significa la cantidad de una molécula de interés que puede recuperarse después de procesar. Por lo general, expresada como un porcentaje de material de partida o del rendimiento.

El término "**fracción retenida**" 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 utiliza membranas microporosas o semipermeables para separar, preferentemente, fluidos o iones sobre la base del tamaño o el peso molecular diferencial. La

ultrafiltración se utiliza normalmente para filtrar moléculas que tienen un peso molecular mayor que aproximadamente 10.000 dalton.

La presente invención se refiere a un procedimiento integrado, continuo y estéril que comprende la fermentación de perfusión continua, la eliminación de partículas y la purificación/concentración. En un aspecto de la invención, el procedimiento comprende filtrar la mezcla de cultivo tisular mediante un procedimiento de separación que separa selectivamente la proteína de interés de la mezcla en un punto de ajuste operativo por debajo del punto de transición de la proteína en la región dependiente de la presión de la curva del flujo frente al PTM para producir un aislado de producto concentrado, sin partículas y parcialmente purificado, en el que el caudal específico a través del procedimiento de separación se mantiene sustancialmente constante a un nivel menor que el punto de transición de la proteína.

En otro aspecto de la invención, el procedimiento es un procedimiento continuo que comprende: (a) producir de forma continua mediante fermentación de perfusión continua una mezcla de fluidos de cultivo tisular heterogénea que contiene una proteína de interés; (b) transferir de forma continua la mezcla de fluido de cultivo tisular a un procedimiento de eliminación de partículas integrado con el sistema de fermentación de perfusión continua; (c) eliminar de forma continua contaminantes particulados del fluido de cultivo tisular en el procedimiento de eliminación de partículas para producir continuamente un fluido de cultivo tisular clarificado que contiene la proteína de interés; (d) transferir de forma continua el fluido de cultivo tisular clarificado a un procedimiento de purificación integrado con el sistema de eliminación de partículas; y (e) separar de forma continua la proteína de interés a partir del fluido de cultivo tisular clarificado en el sistema de purificación para producir de forma continua un aislado de producto estéril libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado que contiene la proteína de interés.

En aún otro aspecto de la invención, el procedimiento es un procedimiento semicontinuo que comprende: (a) producir de forma continua mediante fermentación de perfusión continua una mezcla de fluidos de cultivo tisular heterogénea que contiene una proteína de interés; (b) transferir de forma continua la mezcla de fluido de cultivo tisular a un procedimiento de eliminación de partículas integrado con el sistema de fermentación de perfusión continua; (c) retirar de forma continua los contaminantes particulados del fluido de cultivo tisular en el procedimiento de eliminación de partículas para producir de forma continua un fluido de cultivo tisular clarificado que contiene la proteína de interés; (d) transferir de forma continua el fluido de cultivo tisular clarificado a un vaso de compensación integrado con el procedimiento de eliminación de partículas; (e) transferir de forma intermitente el fluido de cultivo tisular clarificado a un procedimiento de purificación integrado con el vaso de compensación; y (e) separar la proteína de interés del fluido de cultivo tisular 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 el caudal específico de la mezcla a través del procedimiento de fermentación continua y el procedimiento de eliminación de partículas continuo se mantiene sustancialmente constante y, de promedio, es igual al rendimiento promediado en el tiempo del procedimiento de purificación semicontinuo integrado.

#### Dispositivos para poner en práctica los procedimientos de la invención

La presente invención también se refiere a un aparato para separar una proteína de interés a partir de una mezcla de fluido de cultivo tisular heterogénea. En general, el aparato comprende: (a) un sistema de fermentación de perfusión continua; (b) un sistema de eliminación de partículas continuo integrado con el sistema de fermentación de perfusión; y (c) un sistema de purificación continuo integrado con el sistema de eliminación de partículas, en el que el aparato está adaptado para mantener las condiciones estériles. En otro aspecto de la invención, el aparato comprende: (a) a un sistema de fermentación de perfusión continua; (b) un sistema de eliminación de partículas continuo integrado con el sistema de fermentación de perfusión; y (c) un sistema de purificación intermitente integrado con el sistema de eliminación de partículas, en el que el aparato está adaptado para mantener las condiciones estériles. El sistema de purificación puede ser, por ejemplo, un sistema de ultrafiltración o un sistema de adsorción/desorción por convección o cualquier otro sistema capaz de purificar o purificar parcialmente una proteína de interés a partir de una mezcla heterogénea en un sistema integrado, continuo o semicontinuo, estéril, como se describe en el presente documento.

El procedimiento y aparato de la invención están adaptados para permitir el procesamiento continuo de una mezcla de fluidos de cultivo tisular heterogénea, a un caudal sustancialmente constante. En un aspecto particular de la invención, el procedimiento y aparato de la invención están adaptados para permitir el procesamiento continuo de una mezcla heterogénea de fluidos de cultivo tisular a un caudal sustancialmente constante por debajo del punto de transición de la proteína en la región dependiente de la presión de la curva del flujo frente al PTM durante un período continuo y durante todo el procedimiento de purificación.

En realizaciones específicas, la invención proporciona dos nuevos dispositivos (A, B) que están cada uno compuesto por 3 elementos distintos pero totalmente integrados, todos los cuales tienen un papel esencial y en conjunto forman una plataforma de sistema de aislamiento de proteínas continuo eficiente de forma única que resuelve los problemas con la técnica anterior descrita anteriormente.

Los tres elementos distintos de cada dispositivo son, en primer lugar, un sistema de eliminación de partículas continuo integrado (100), en segundo lugar, un vaso de compensación (200) estéril y, en tercer lugar, un sistema de



concentración/purificación integrado (300 400, respectivamente). Los tres elementos y, de este modo, los nuevos dispositivos y procedimientos desarrollados de uso de estos dispositivos se describen con detalle a continuación.

5 Para proporcionar una concentración/purificación continua o semicontinua integradas del producto proteico, el dispositivo A de la invención (del que se muestran dos realizaciones en la Figura 2) comprende un sistema de ultrafiltración integrado continuo y estéril (300), mientras que el dispositivo B de la invención (del que se muestran 2 realizaciones en la Figura 3) comprende un sistema integrado de adsorción/desorción por convección semicontinuo (400).

Los dispositivos de la invención están integrados directamente con uno o más fermentador(es) de perfusión continua y, por tanto, forman una nueva plataforma de fabricación continua integrada.

## 10 DISPOSITIVO A

### Sistema de eliminación de partículas continuo integrado (100)

La figura 2 muestra 2 realizaciones de dispositivo A de la invención. El sistema de eliminación de partículas continuo integrado (100) está conectado directamente al lado de la cosecha del sistema de fermentación de perfusión continua (1).

15 La figura 4 muestra una representación esquemática más detallada de una realización del sistema de eliminación de partículas integrado continuo de la invención (100), que consiste en una bomba (101), un manómetro o transmisor, respectivamente (107), un colector de conexión (102) y un conjunto de varios trenes de filtro (103). Todos los componentes están conectados con un tubo flexible y/o tubos rígidos.

20 La bomba (101) es una bomba peristáltica convencional, que permite el bombeo suave de la cosecha de cultivo celular sin ninguna parte o sello rotativo en contacto el producto estéril. La bomba los tubos de la bomba están dimensionados para liberar el caudal de la cosecha deseado del sistema de fermentación de cultivo celular, que es de 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.

25 El manómetro o transmisor de presión (107) está diseñado de tal manera que se puede esterilizar en autoclave o por irradiación. En el diseño actual, se utiliza un transmisor piezorresistivo reutilizable en una carcasa de acero inoxidable o un manómetro de acero inoxidable reutilizable. Sin embargo, las futuras mejoras pueden incluir el uso de transmisores desechables que pueden ser fácilmente esterilizados mediante irradiación.

30 En la presente realización, el colector de conexión (102) consiste en tubos flexibles, con pinzas (o válvulas) y conectores estériles adecuados para permitir la conexión de los conjuntos de tren de filtro adicionales sin comprometer la esterilidad del sistema. Preferiblemente, los diámetros de los tubos están dimensionados para producir velocidades de fluido lineales de aproximadamente 2 m/s o menos a los caudales deseados, evitando de este modo altas contrapresiones y cizallamiento. En otra realización presente, en lugar de los conectores estériles se utilizan piezas especiales de tubos flexibles que se pueden soldar con soldadores de tubos comerciales sin comprometer la esterilidad. Tales piezas de tubos están hechos de PVC u otros polímeros adecuados.

35 El conjunto de tren de filtro (103) consiste en al menos dos, preferiblemente múltiples trenes de filtro idénticos (como se muestra en el esquema), con solo uno de los trenes de filtro abierto en cualquier momento dado, como se muestra como ejemplo en la figura 4 (105).

40 Cada tren de filtro consiste en al menos un filtro, preferiblemente un prefiltro y un último filtro en serie (como se muestra en la Figura 4). Si es necesario aumentar la capacidad para una aplicación específica, cada tren de filtro (105, 106 etc.) en sí también puede consistir en múltiples filtros o trenes de filtro en paralelo (no mostrado).

45 En una realización de la invención mostrada en la Figura 4, el segundo tren de filtro del conjunto (106) está cerrado mediante un disco de rotura sensible a la presión, o pasador de rotura, respectivamente (104). En funcionamiento, la función del disco de ruptura, o pasador de ruptura, es abrir automáticamente la trayectoria de flujo para el tren segundo filtro (107) una vez que la presión en el tren primer filtro (105) alcanza un límite especificado, asegurando de esta manera ininterrumpida continuación del procedimiento de filtración. Los discos de rotura, o pasadores de rotura, disponibles comercialmente se utilizan en el sistema de la invención, que, de otro modo, se usan para proporcionar alivio de presión de seguridad. En una realización presente, se utilizan discos de rotura pasadores de rotura con límite de presión de rotura especificado de no más de 16 PSI, que se ha demostrado que son muy útiles. Sin embargo, es posible un intervalo del límite de presión especificado.

50 Cada tren filtro adicional del conjunto de tren de filtro también está separado por una válvula manual o automática y otro disco de rotura o pasador de rotura. Una vez que el segundo tren de filtro (106) está en funcionamiento, la válvula al siguiente disco de rotura o pasador de rotura, respectivamente, se abre, de manera que el próximo tren filtro puede actuar como una copia de seguridad y así sucesivamente.

5 En una realización alternativa, se usan exclusivamente válvulas accionadas automáticamente, y en funcionamiento, un sistema de control acciona las válvulas en base a la entrada de un sensor de presión piezorresistivo (107), que también se puede esterilizar en autoclave. Sin embargo, los solicitantes descubrieron que el presente diseño que comprende el disco de rotura o pasador de rotura, respectivamente, proporciona una robustez excepcional en el funcionamiento a largo plazo.

La clasificación del filtro final es de al menos 3  $\mu\text{m}$  o menor, preferiblemente 0,45  $\mu\text{m}$  y aún preferiblemente 0,2  $\mu\text{m}$ . Por tanto, el tren de filtro de funcionamiento (6) conserva todas las células restantes, así como restos celulares relevantes y otras partículas, que dan como resultado una corriente de salida libre de partículas (9), el fluido de cultivo tisular clarificado (FCTc).

10 Se pueden usar diferentes materiales de filtro disponibles en el mercado. En el diseño actual, se utilizan cápsulas de filtro desechables, tales como cápsulas prefiltro Sartopure o Sartoclear (Sartorius, Goettingen) y cápsulas de filtro finales Sartobran (Sartorius, Goettingen), que pueden esterilizarse mediante autoclave o por irradiación.

15 Como ejemplo de una presente realización del dispositivo de la invención, diseñado para un caudal de 1 litro/min, cada tren de filtro (105, 106 etc.) del conjunto (103) consiste en 3 cápsulas prefiltro 30" (Kleopak Ultipleat, Pall Corp., clasificadas de 4,5  $\mu\text{m}$ , 0,75  $\text{m}^2$  cada una) seguido de 3 cápsulas de filtro finales de 20" (Sartobran P, Sartorius, clasificadas de 0,45  $\mu\text{m}$ /0,2  $\mu\text{m}$ , 1.3  $\text{m}^2$  cada una). Se ha descubierto que esta realización particular es útil para la fabricación a gran escala de factor de coagulación sanguínea VIII recombinante, así como variantes del FVIII modificado genéticamente, incluyendo el FVIII con el dominio B delecionado.

20 Sin embargo, los solicitantes han descubierto que cuando se utiliza el dispositivo y el procedimiento de la invención, la eficiencia de eliminación de partículas con diversos materiales de filtro disponibles y configuraciones de diferentes fabricantes (Pall, Sartorius, Cuno) mejora de forma consistente y significativa en comparación con los respectivos procedimientos discontinuos convencionales.

25 Por lo tanto, los nuevos dispositivo y procedimiento de la invención también serán beneficiosos para su uso con nuevos tipos de filtros y geometrías, por ejemplo con tipos de filtro que aumentan el área de filtro disponible por cápsula, así como, con tipos de filtro que proporcionan un patrón de flujo cruzado u otros medios para reducir al mínimo la acumulación de torta, tales como la vibración o la rotación del elemento de filtro.

30 En otra realización del procedimiento del invento, el conjunto de tren de filtro (103) comprende sólo un tren de filtro de seguridad estéril cerrado por un disco de rotura o pasador de rotura, respectivamente, pero aún múltiples trenes de filtro para el funcionamiento. El primer tren de filtro del conjunto se hace funcionar hasta que se ha procesado un volumen de carga específico predeterminado, después de lo cual se cambia la operación (a manual o automática) al próximo tren de filtro en el conjunto. El volumen de carga específico se especifica de manera que en condiciones de funcionamiento normales no se supere el límite de presión del disco de rotura o pasador rotura. Sin embargo, si la presión aumenta más de lo normal durante la filtración, por ejemplo debido a una inusualmente baja filtrabilidad de la cosecha, el tren filtro de seguridad asegura de nuevo la filtración continua ininterrumpida mediante la abertura de una vez se excede la presión especificada. Después de una abertura del tren de filtro de seguridad, la filtración se cambia a otro tren de filtro del conjunto y se instala otro tren de filtración de seguridad con disco de rotura o pasador de rotura sin comprometer la esterilidad del sistema.

35 Es bien conocido para los expertos en el campo que para mantener al mínimo los costes del filtro y los tiempos de procesamiento para los procedimientos de eliminación de partículas discontinuos, los trenes de filtro discontinuos tienen que dimensionarse de modo que tengan el área del filtro más baja posible requerida para proporcionar el caudal absoluto deseado (en litros/hora) y la presión máxima. El caudal absoluto deseado, a su vez, tiene que ser lo suficientemente alto como para proporcionar tiempos de procesamiento factibles para el volumen del lote deseado. Esto requiere inherentemente un caudal específico alto (en litros/hora/ $\text{m}^2$  del área de filtro).

40 En contraste con un sistema de filtración por lotes optimizado comparable, el dispositivo de la invención está diseñado para un caudal específico varias veces menor, que se mantiene constante (en litros/hora/ $\text{m}^2$  de área de filtro instalado), de modo que el caudal absoluto es igual al caudal de cosecha de la fermentación de perfusión continua.

45 Los solicitantes descubrieron inesperadamente que a tales caudales específicos bajos, el volumen que puede procesarse a través de un filtro es desproporcionadamente más alto que a los caudales ajustadas en procedimientos discontinuos.

50 Es importante señalar que en los procedimientos de aislamiento discontinuos convencionales, dichos caudales específicos bajos no serían factibles debido a áreas de filtración extremas (y, por tanto, costes) o un caudal absoluto demasiado bajo. Esto es principalmente porque la mayor parte del tiempo, el equipo de eliminación de partículas discontinuo se encuentra inactivo, mientras que se está recogiendo la cosecha para el siguiente lote. Por otra parte, el aumento desproporcionado sorprendente en la capacidad del filtro que puede alcanzar el procedimiento de la invención permite una reducción significativa del consumo de filtro y, por tanto, de los costes de fabricación.

Vaso de compensación (200)

La salida del sistema de eliminación de partículas continuo integrado está directa y constantemente conectado a un vaso compensación (201), como se muestra en la figura 2. Este vaso de compensación es un vaso estéril, tal como, una bolsa desechable o un vaso de acero inoxidable con al menos un puerto de entrada y un puerto de salida, estando el último, preferiblemente, en la parte inferior del vaso. Se puede usar una amplia gama de tamaños y diseños de vasos. Sin embargo, el vaso de compensación está dimensionado, preferiblemente, para que sea pequeño en comparación con el rendimiento volumétrico del sistema para mantener el tiempo de residencia del producto en el vaso en un mínimo, es decir, por debajo de 24 horas, preferiblemente por debajo de 8 horas y aún más preferentemente por debajo de 4 horas.

Los solicitantes descubrieron que los tiempos de residencia del producto tan bajos, únicamente posibles debido a los dispositivos de la invención, permiten un aumento significativo del rendimiento para los productos de proteína inherentemente inestables, resolviendo así uno de los problemas de la técnica anterior.

En algunas realizaciones de los dispositivos de la invención, el vaso de compensación está situado en una célula de equilibrio o de carga (202), como se muestra para el dispositivo B1 y B2 en la Figura 3. Esta célula de equilibrio o de carga proporciona una señal de peso a un sistema de control computarizado (no mostrado).

Además, en una realización de los dispositivos de la invención (B2), un vaso de tampón (204) está conectado a través de una bomba peristáltica (203) al vaso de compensación. En funcionamiento, esta configuración se utiliza para ajustar las propiedades de la corriente de cosecha libre de partículas, tal como la conductividad (fuerza iónica) o el pH, mediante la adición de tampón o diluyente adecuado. En este caso, se usa un sistema de mezcla (205) opcional y sensores para monitorizar la condición deseada (206), tal como el pH o la conductividad. En el presente diseño, se utiliza un agitador acoplado magnéticamente; sin embargo, también se podrían usar otros sistemas de mezcla, tales como agitadores o dispositivos pulsantes.

Concentración/purificación continuas integradas (300)

El dispositivo A, del que se muestran 2 realizaciones en la Figura 2, comprende un sistema de ultrafiltración continuo integrado estéril (300). Las realizaciones del sistema de ultrafiltración continuo estéril comprenden una bomba de reciclado (301) y bucle de reciclado (306), uno o más módulos de ultrafiltración de flujo cruzado (303) estériles, una bomba de permeado (305), un vaso receptor del permeado (307) estéril en una célula de equilibrio o carga (309) y una bomba de fracción retenida (311). Además, comprende instrumentación en forma de un manómetro o transmisor (302) de entrada, un manómetro o transmisor de presión del permeado (304), un manómetro o transmisor (308) de salida, así como, un medidor de flujo de reciclado (310). En funcionamiento, la salida del sistema (312) proporciona una corriente continua del producto proteico concentrado y parcialmente purificado, que pueden recogerse de forma continua, congelarse o procesarse adicionalmente.

La realización de la invención A2 comprende además un vaso de tampón o diluyente (314), una bomba peristáltica de adición de tampón/diluyente (313), así como, sensores de flujo continuo para monitorizar el acondicionamiento del concentrado en el bucle de reciclado, tales como sensores de pH y de conductividad (315, 316). En funcionamiento, esta configuración se utiliza para ajustar las propiedades de la corriente de cosecha libre de partículas, tal como la conductividad (fuerza iónica) o el pH, mediante la adición de tampón o diluyente adecuado. Esta configuración también se puede utilizar para añadir estabilizantes de proteínas. Aunque en una realización de la invención A2, el propio bucle de reciclado actúa como una cámara de mezcla, como alternativa, el acondicionamiento puede también llevarse a cabo utilizando una configuración del vaso de compensación como se muestra para el dispositivo B (realización B2), que comprende los componentes (203, 204, 205, 206) como se discute más adelante en esta descripción (véase, la descripción del dispositivo B).

Las realizaciones del dispositivo de la invención también comprenden un sistema de registro de datos y de control programable, que registra las señales de datos entrantes de la instrumentación (tales como, pero sin limitaciones, presiones, caudales, el peso del vaso, el pH, la conductividad) y controla las velocidades de la bomba de acuerdo con un algoritmo de control predefinido.

Todas las bombas (301, 305, 311, 313) son bombas peristálticas, que permiten el bombeo de las respectivas corrientes de fluido sin que partes o sellos rotativos entren en contacto con la corriente de producto estéril. Los solicitantes descubrieron que esto es preferible proporcionar un funcionamiento sólido estéril a largo plazo. Sin embargo, en principio se pueden usar otros diseños de bombas estériles. La bomba de reciclado (301) y sus tubos de bomba está dimensionada para permitir el ajuste sólido de los caudales de flujo cruzado deseados de entre 80 y 800 litros/hora por m<sup>2</sup> de área de membrana instalada, dependiendo de las características de transferencia de masa del módulo de ultrafiltración utilizadas. La bomba de permeado está dimensionada para permitir un ajuste sólido y preciso de un flujo de permeado específico de entre 90 % y 99 % del caudal de la cosecha de la fermentación de perfusión continua. La bomba de la fracción retenida está dimensionada para permitir un ajuste sólido y preciso del flujo de la fracción retenida de entre 1 % y 10 % del caudal de la cosecha de la fermentación de perfusión continua.

Los módulos de ultrafiltración encapsulados (303) se utilizan para permitir el funcionamiento sólido estéril y se esterilizan en autoclave o por irradiación. El valor de corte del peso molecular nominal óptimo se elige basándose en

el peso molecular del producto proteico de de interés y tiene que confirmarse mediante experimentos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden usar diversos materiales de membrana, tales como poliétersulfona, poliétersulfona hidrofílica o celulosa regenerada, siempre y cuando todo el módulo de membrana se puede esterilizar por irradiación y/o en autoclave sin dañar la membrana. Se espera que los materiales hidrofílicos puedan aumentar la eficiencia debido a su menor tendencia a ensuciarse.

Los solicitantes descubrieron que el dispositivo A es singularmente eficiente si el área total de la membrana de la ultrafiltración instalada en metros cuadrados es igual a un intervalo de entre 0,1 a 2 veces el caudal volumétrico de la cosecha de la fermentación de perfusión continua en litros/hora. Por ejemplo, para un caudal de la cosecha de perfusión de 1 litro/hora, el área de membrana instalada total debe ser de entre 0,1 y 2 metros cuadrados. Los solicitantes descubrieron que el dispositivo A todavía es más eficiente, si el área de la membrana de ultrafiltración instalada en metros cuadrados es igual a un intervalo de entre 0,3 a 1 veces el caudal volumétrico de la cosecha de la fermentación de perfusión continua en litros/hora.

En una realización de la invención, se utilizan módulos de membrana de fibra hueca "desechables" comercialmente disponibles (GE Healthcare, antes Amersham Biosciences). Sin embargo, se pueden usar diversas membranas encapsuladas y diseños de módulo, tales como módulos de enrollado en espiral, casetes o cápsulas encapsulados con mayor transferencia de masa debido a los patrones de flujo secundario (por ejemplo, flujo de vórtice), los elementos rotatorios (por ejemplo, filtros de disco dinámicos) o filtros vibrantes. Cabe esperar que se puedan usar casetes de ultrafiltración especialmente encapsulados de forma beneficiosa en los dispositivos de la invención, ya que proporcionan altos coeficientes de transferencia de masa a un caudal de flujo cruzado requerido relativamente bajo, reduciendo de ese modo la capacidad de la bomba, manteniendo la complejidad del sistema y los costes de inversión bajos.

El dispositivo de la invención permite un funcionamiento no solo continuo, sino también en esterilidad, en contraste con un funcionamiento apenas aséptico. Los solicitantes logran esto diseñando todos los componentes del sistema de contacto con el producto para soportar no solo la limpieza, sino también la esterilización en autoclave, vapor en su lugar o irradiación gamma. En las presentes realizaciones se usan módulos encapsulados desechables para la eliminación continua de partículas (100), así como ultrafiltración continua (300). Las bombas peristálticas se utilizan para evitar cualquier contacto del producto con elementos rotatorios y sellos mecánicos. Por otra parte, en las presentes realizaciones se usan conjuntos de tubos y bolsas desechables en lugar de tubos duros. Los componentes de contacto con el producto desechables (por ejemplo, tubos, bolsas, módulos) o grupos de componentes se preensamblan y esterilizan, simplificando de este modo la puesta en marcha y el funcionamiento. Los sistemas están diseñados para mantener al mínimo cualquier apertura potencial del sistema estéril al medio ambiente (por ejemplo, campana de flujo laminar), como para el muestreo o intercambio de bolsa o instrumentación. En las presentes realizaciones del dispositivo, los colectores están diseñados redundantes para permitir el cambio de un componente estéril (por ejemplo, una bolsa receptora de producto) al siguiente sin abrir. El intercambio adicional de tubos, módulos o bolsas se realiza, preferiblemente, mediante el uso de soldadores de tubos estériles en lugar de conectores estériles.

Otras realizaciones futuras de dispositivos de la invención también podrían comprender componentes, tales como vasos de acero inoxidable, carcasas de filtros o tuberías que pueden esterilizarse en su lugar, solos o en combinación con componentes desechables, siempre que se asegure la robustez y la esterilidad en funcionamiento a largo plazo.

Las realizaciones adicionales de dispositivo A de la invención están diseñados para procesar el material de múltiples fermentadores en plantas de fabricación más grandes (A3). En la figura 5 se muestra un ejemplo esquemáticamente. Otras realizaciones están diseñadas para aumentar el factor de concentración global y el rendimiento de separación mediante la combinación de 2 etapas de los sistemas de ultrafiltración continua (300) en serie (A4, que se muestra esquemáticamente en la Figura 5).

#### Descripción del procedimiento de uso de dispositivo A

Las fermentaciones de perfusión continua se realizan durante un largo período de tiempo (una campaña), típicamente entre 2 semanas y 6 meses o más. El fluido de cultivo tisular (TCF) que contiene producto, células y residuos celulares se procesa de forma continua utilizando el dispositivo A. Se produce una corriente de producto estéril, libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado (el "aislado de producto") y sale de forma continua del dispositivo por su salida (312). Mediante el uso de la bomba (101) del sistema de eliminación de partículas (100) estéril continuo, se bombea la cosecha de forma continua a través del conjunto de filtración (103) al caudal de la cosecha de perfusión deseado  $Q_h$  de la fermentación.

La corriente de salida del sistema de filtración continuo, es decir, el fluido de cultivo tisular clarificado (FCTc) entra de forma continua en el vaso de compensación (201). Desde el vaso de compensación, el FCTc se procesa de forma continua mediante un sistema de ultrafiltración (300) continuo, estéril a un caudal igual al caudal procedente de la fermentación de perfusión continua. Debido al pequeño tamaño del vaso de compensación con respecto a los caudales ajustados, el tiempo de residencia medio del producto en el vaso se mantiene en un mínimo, es decir, por debajo de 12 horas, preferiblemente por debajo de 4 horas y aún preferiblemente por debajo de 2 horas.

El flujo cruzado adecuado y, por tanto, la transferencia de masa, se ajusta en el módulo de ultrafiltración a través de la bomba de reciclado (301). El caudal de la fracción retenida se ajusta y se controla mediante el uso de la bomba de la fracción retenida (311), produciendo de este modo un caudal constante y continuo  $Q_i$  del aislado de producto concentrado que sale del dispositivo A por su salida (312). La bomba de permeado (305) se utiliza para ajustar y controlar el caudal  $Q_p$  del permeado, que se extrae de forma continua desde el lado del permeado del módulo o módulos de ultrafiltración y que consiste en agua y los componentes de las soluciones lo suficientemente pequeños para pasar a través de la membrana de ultrafiltración (por ejemplo, sales, proteínas pequeñas).

Los caudales del permeado ( $Q_p$ ) y la fracción retenida/aislado ( $Q_i$ ) se ajustan y controlan cuidadosamente para que coincida con el caudal de la cosecha  $Q_h$  de la fermentación de manera que:

$$Q_p + Q_i = Q_h$$

Al mismo tiempo, las caudales se ajustan y controlan, de manera que se alcanza un factor de concentración  $cf$  deseado satisfaciendo:

$$Q_i = 1/cf * Q_h$$

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

Dado que los caudales de salida son controlados por las bombas (305) y (311), el sistema de ultrafiltración extrae automáticamente un flujo de  $Q_p + Q_i$  desde el vaso de compensación pequeño (201).

En caso de usar la realización A2 (véase la Figura 2 a la derecha), una corriente estéril de tampón o agua para inyección desde el vaso 314 se añade al sistema de ultrafiltración continuo de forma continua a un caudal constante  $Q_b$  utilizando la bomba de adición de tampón (313). Por lo tanto, las condiciones del aislado pueden ajustarse libremente y de forma continua, por ejemplo, en términos de fuerza iónica, pH, adición de estabilizantes, etc. Por lo tanto, los caudales se controlan en

$$Q_p + Q_i = Q_h + Q_b$$

Además, se pueden elegir relaciones del caudal de manera que se alcanza un factor de concentración deseado  $cf$  satisfaciendo  $Q_i = 1/cf * (Q_h + Q_b)$ . Como alternativa, este procedimiento se puede utilizar solo para alterar las condiciones (por ejemplo, el pH, la conductividad), estableciendo  $Q_i = Q_h + Q_b$

El nuevo procedimiento de utilizar el dispositivo A también contrasta con los procedimientos de UF discontinuos (técnica anterior) en términos del punto de ajuste de la propia ultrafiltración. Los procedimientos de UF discontinuos convencionales están diseñados para un determinado rendimiento a través de un área de membrana baja en un corto período de tiempo. Por tanto, la UF discontinua generalmente se realiza en el punto de presión de transición dependiente de la región controlada de transferencia de masa (véase la figura 9). Esto conduce a un flujo específico inicial deseablemente alto que, sin embargo, disminuye significativamente y rápidamente en el transcurso de segundos a minutos, a medida que la polarización de la concentración conduce rápidamente a contrapresión osmótica y la formación de una capa de gel limitante (membrana secundaria). Una concentración de la pared tan alta de macromoléculas también conduce a un aumento de la adsorción de compuestos a la superficie de la membrana interna y externa, es decir, a ensuciamiento de la membrana. Este ensuciamiento reduciría aún más el flujo del permeado con el tiempo.

Los solicitantes descubrieron sorprendentemente que con el dispositivo A se consiguen capacidades de carga general por área de membrana de ultrafiltración instalada muchas veces más altas mediante el accionamiento en el extremo inferior de la curva de presión - flujo (véase la Figura 9):

La concentración de la pared,  $c_{pared}$ , normalizada de un componente totalmente retenido puede describirse de la siguiente manera:

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

con

$J$  = flujo del permeado específico en litros/hora/m<sup>2</sup>

$k_d$  = coeficiente de transferencia de masa en litros/hora/m<sup>2</sup>

$c_{volumen}$  = coeficiente del componente en el volumen de la solución

Al igual que en el lote de UF, la UF continua se hace funcionar a un coeficiente de transferencia de masa optimizada para minimizar la polarización de la concentración. Sin embargo, en contraste con la ultrafiltración discontinua, los solicitantes ajustan el flujo del permeado J en el límite inferior de la curva de presión-flujo (véase la Figura 9). Como resultado de la relación exponencial, la concentración de la pared cpared en la superficie de la membrana, por tanto, es significativamente menor de lo que sería en la ultrafiltración discontinua. Por ejemplo, la presente forma de realización del procedimiento de la invención ajusta un flujo de permeado específico objetivo de aproximadamente 1/10 del coeficiente de transferencia de masa alcanzable, ajustando de ese modo una concentración de pared de solo el 10% por encima de la concentración del volumen (o fracción retenida) ajustada.

La siguiente Tabla 1 muestra un ejemplo de un procedimiento para utilizar el dispositivo A (realización A1) para el aislamiento continuo de un producto proteico a partir de un fermentador a escala de desarrollo:

**Tabla 1**

Ejemplo de procedimiento para usar una realización presente del dispositivo A para el aislamiento continuo de un producto proteico de la fermentación de perfusión continua	
Parámetro opcional	Diana
Caudal de la cosecha Qh de perfusión continua (controlada con la bomba 101)	5 litros/hora (120 litros/día)
Caudal del permeado QP (controlado con la bomba 305)	4,75 litros/hora
Caudal de la fracción retenida (aislado de producto) Qi (controlado con la bomba 311)	0,25 litros/hora
Flujo específico del permeado J	2 litros/hora/m <sup>2</sup>
Factor de concentración cf	20 veces

Para cada molécula de producto individual, se puede definir un criterio duradero para la configuración de la ultrafiltración continua estéril, por ejemplo, basándose en la presión transmembrana. Una vez que se excede el límite de presión transmembrana, la configuración de la ultrafiltración continua estéril se intercambia contra otra configuración idéntica sin comprometer la integridad y la esterilidad del sistema. Esto puede realizarse en analogía con la configuración de la filtración continua estéril mediante el uso de cualquiera de colectores y conectores estériles, o mediante el uso de soldadores de tubos flexibles desechable y de tubos estériles.

**DISPOSITIVO B**

**Sistema de eliminación de partículas continuo integrado (100)**

La figura 3 muestra 2 realizaciones de dispositivo B de la invención. El sistema de eliminación de partículas continuo integrado (100) está conectado directamente al lado de la cosecha del sistema de fermentación de perfusión continua (1). Esta parte del dispositivo B es idéntica al dispositivo A (véase la descripción detallada del dispositivo A y la Figura 4, anterior).

**Vaso de compensación (200)**

La salida del sistema de eliminación de partículas continuo integrado está directa y constantemente conectado a un vaso compensación (201), como se muestra en la figura 3. Este vaso de compensación es un vaso estéril, tal como, una bolsa desechable o un vaso de acero inoxidable con al menos un puerto de entrada y un puerto de salida, estando el último, preferiblemente, en la parte inferior del vaso. Se puede usar una amplia gama de tamaños y diseños de vasos. Sin embargo, el vaso de compensación está dimensionado, preferiblemente, para que sea pequeño en comparación con el rendimiento volumétrico del sistema para mantener bajo el tiempo de residencia del producto en el vaso, es decir, por debajo de 26 horas, preferiblemente por debajo de 12 horas y aún más preferentemente por debajo de 4 horas.

En el dispositivo B, el vaso de compensación está situado en una célula de equilibrio o de carga (202), como se muestra en las realizaciones B1 y B2 en la Figura 3. Esta célula de equilibrio o de carga proporciona una señal de peso a un sistema de control computarizado (no mostrado).

Además, en una realización de los dispositivos de la invención (B2), un vaso de tampón (204) está conectado a través de una bomba peristáltica (203) al vaso de compensación. En funcionamiento, esta configuración se utiliza para ajustar las propiedades de la corriente de cosecha libre de partículas, tal como la conductividad (fuerza iónica) o el pH, mediante la adición de componentes para la modificación de las propiedades del tejido clarificado cultivado recibido del sistema de eliminación de partículas, tal como un tampón o diluyente adecuado, o un estabilizante de proteínas adecuado. En este caso, una presente realización también comprende un sistema de mezcla (205) opcional y sensores para monitorizar la condición deseada (206), tal como el pH o la conductividad. En esta presente realización, se utiliza un agitador acoplado magnéticamente; sin embargo, también se podrían usar otros sistemas de mezcla, tales como agitadores o dispositivos pulsantes.

5 En otra realización de dispositivo de invención, se utilizan 2 vasos de compensación. En cualquier momento dado, un vaso de compensación está conectado directamente al sistema de eliminación de partículas continuo (100), recibiendo de ese modo fluido clarificado, mientras que el otro está conectado al sistema de concentración/purificación semicontinuo (400), alimentando de este modo un ciclo de adsorción/desorción por convección. El cambio entre ambos se realiza a través de un sistema de control, utilizando el peso del vaso de recepción para activar un interruptor una vez que se alcanza su volumen máximo de llenado.

#### Concentración/purificación semicontinuas integradas (400)

El dispositivo B, del que se muestran 2 realizaciones en la Figura 3, comprende un sistema de adsorción/desorción semicontinuo integrado por convección (400).

10 El sistema de adsorción/desorción semicontinuo integrado por convección está diseñado y dimensionado de manera que su caudal de carga ( $Q_{carga}$ ) es significativamente mayor que el caudal de el procedimiento de recolección de perfusión continua y de filtración continua ( $Q_h$ ), es decir  $Q_{carga} \gg Q_h$ .

15 Las realizaciones del sistema de concentración/purificación semicontinuo integrado (400) comprenden una bomba de carga (401), un conjunto de válvula de múltiples puertos (402) y varios vasos de tampón (404), una válvula de 3 vías (403) conectado a un vaso receptor de residuos estéril (413) y uno o más módulos de adsorción de convección (406), manómetros o transmisores de entrada y de salida (405, 408), otra instrumentación, tales como sensores de UV (409), de pH y de conductividad (409, 410), medidor de flujo (412), así como otra válvula de 3 vías (407) conectada también al vaso de residuos (413) y la salida del eluato de producto (414).

20 Las realizaciones del dispositivo de la invención también comprenden un sistema de registro de datos y de control programable (no mostrado), que registra las señales de datos entrantes de la instrumentación (tales como, pero sin limitaciones, presiones, UV, el pH, la conductividad, el caudal, el peso del vaso de compensación) y controla los vasos automáticos y la bomba de acuerdo con protocolos programados.

25 La bomba de carga (401) es, preferentemente, una bomba peristáltica para evitar el contacto directo del producto o tampones estériles con cualquier sello o partes mecánicas. Los solicitantes descubrieron que esto es preferible proporcionar un funcionamiento sólido estéril a largo plazo. Sin embargo, en principio se pueden usar otros diseños de bombas estériles. La bomba de carga se dimensiona en función del volumen de la matriz instalada del adsorbente de convección (406) para permitir el ajuste sólido de al menos 12 volúmenes de matriz/minuto. Por ejemplo, en una realización presente, se usan cápsulas adsorbentes de membrana Mustang (Pall Corp.) que tienen un volumen de la matriz de aproximadamente 0,3 litros. Por lo tanto, la bomba de carga está dimensionada para permitir caudales de carga de hasta 3,6 litros/minuto.

35 La función del conjunto de la válvula de múltiples puertos (402) es permitir el cambio entre el producto que contiene la carga extraído del vaso de compensación (201) y cada uno de los tampones estériles y soluciones de limpieza de los vasos de tampón estéril (404). Las presentes realizaciones del dispositivo B utilizan una serie de válvulas de pinza accionadas automáticamente, que pinzan el tubo flexible conectado a cada vaso de tampón desde el exterior para cerrar y abrir cada línea. Los solicitantes descubrieron que estas válvulas de pinza proporcionan una solución particularmente beneficiosa para el dispositivo B, ya que evitan cualquier contacto con el producto y, por lo tanto, no necesitan limpiarse o esterilizarse. Sin embargo, se puede usar una amplia gama de válvulas comerciales adecuadas para el procesamiento estéril y conocidas por los expertos en el campo, tales como válvulas de membrana activadas.

40 En la presente realización, las válvulas de 3 vías (403, 407) son válvulas de membrana activadas que se pueden esterilizar en autoclave. Sin embargo, en principio, se puede usar una variedad de válvulas comerciales adecuadas para el procesamiento estéril, incluidas las válvulas de, por ejemplo, pinza.

45 El módulo adsorbente de convección (406) contiene una matriz cromatográfica con transferencia de masa predominantemente de convección del producto a la superficie de adsorción y, en contraste con la cromatografía convencional, se esteriliza antes de la operación en autoclave, al vapor o de irradiación. La transferencia de masa predominantemente de convección permite, en contraste con la cromatografía de lecho relleno convencional, tiempos de ciclo de adsorción/elución/regeneración muy bajos, que los solicitantes utilizan en el dispositivo de la invención para realizar la operación semicontinua.

50 En la presente realización del dispositivo de la invención, el adsorbente de convección (406) consiste en una o más cápsula(s) adsorbentes de membrana disponibles comercialmente con química de intercambio iónico (Mustang, corporación Pall o Sartobind, Sartorius). Sin embargo, el dispositivo puede utilizar otros materiales y geometrías adsorbentes de membrana y nuevas matrices de convección, tales como matrices monolíticas también, ya que, en contraste con la cromatografía convencional, el relleno de la resina se elimina y, generalmente, las matrices se pueden encapsular en módulos listos para usar.

55 Por otra parte, otras químicas, incluyendo matrices de afinidad de convección que comprenden ligandos específicos de unión al producto, también producirán un rendimiento excepcionalmente beneficioso en el dispositivo de la invención.

En una realización de dispositivo de la invención, se usan múltiples módulos adsorbentes de convección en el dispositivo en forma de un conjunto de trenes de adsorción de convección en paralelo, similar al sistema de eliminación de partículas (100) continuo. Todo el conjunto con todos los trenes adsorbentes se esterilizan juntos, lo que permite durante el funcionamiento el cambio desde un tren adsorbente a uno fresco si el primero uno llegar al final de su vida útil, tal como se determina, por ejemplo, mediante un criterio predefinido, tal como contrapresión durante la carga o el número máximo de ciclos de funcionamiento realizados. Cada tren adsorbente consiste en un módulo individual o múltiples módulos de adsorción de convección en paralelo y/o en serie para aumentar la capacidad de unión y/o mejorar la utilización de la capacidad.

Es importante destacar que el dispositivo de la invención permite un funcionamiento no solo continuo, sino también en esterilidad, en contraste con un funcionamiento apenas aséptico. Los solicitantes logran esto diseñando todos los componentes del sistema de contacto con el producto para soportar no solo la limpieza, sino también la esterilización en autoclave, vapor en su lugar o irradiación gamma. En las presentes realizaciones se usan módulos encapsulados desechables para la eliminación continua de partículas (100), así como la adsorción/desorción de convección (400) estéril semicontinua. Las bombas peristálticas se utilizan para evitar cualquier contacto del producto con elementos rotatorios y sellos mecánicos. Por otra parte, en las presentes realizaciones se usan conjuntos de tubos y bolsas desechables en lugar de tubos duros. Los componentes de contacto con el producto desechables (por ejemplo, tubos, bolsas, módulos) o grupos de componentes se preensamblan y esterilizan, simplificando de este modo la puesta en marcha y el funcionamiento. Los sistemas están diseñados para mantener al mínimo cualquier apertura potencial del sistema estéril al medio ambiente (por ejemplo, campana de flujo laminar), como para el muestreo o intercambio de bolsa o instrumentación. En las presentes realizaciones del dispositivo, los colectores están diseñados redundantes para permitir el cambio de un componente estéril (por ejemplo, una bolsa receptora de producto) al siguiente sin abrir. El intercambio adicional de tubos, módulos o bolsas se realiza, preferiblemente, mediante el uso de soldadores de tubos estériles en lugar de conectores estériles.

Otras realizaciones futuras de dispositivos de la invención también podrían comprender componentes, tales como vasos de acero inoxidable, carcasas de filtros o tuberías que pueden esterilizarse en su lugar, solos o en combinación con componentes desechables, siempre que se asegure la robustez y la esterilidad en funcionamiento a largo plazo.

Las realizaciones adicionales de dispositivo B de la invención están diseñadas para procesar el material de múltiples fermentadores en plantas de fabricación más grandes (B3). En la figura 6 se muestra un ejemplo esquemático. Otras realizaciones del dispositivo B de la invención están diseñados para aumentar el factor de concentración global y el rendimiento de separación mediante la combinación de varios sistemas de adsorción/desorción por convección (400) en serie, con los respectivos vasos de compensación estériles entremedias (200) (véase la Figura 6, B4).

Otras realizaciones más de dispositivos de la invención están diseñadas para aumentar el factor de concentración y rendimiento de separación en general mediante la combinación de un sistema de ultrafiltración continua (300) en serie con un sistema de adsorción/desorción de convección semicontinuo (400) a través de un vaso de compensación adicional. Un ejemplo de una forma de realización se muestra esquemáticamente en la Figura 7.

#### Descripción del procedimiento de uso del dispositivo B

Las fermentaciones de perfusión continua se realizan durante un largo período de tiempo (una campaña), típicamente entre 2 semanas y 6 meses o más. El fluido de cultivo tisular (TCF) que contiene producto, células y residuos celulares se procesa de forma continua utilizando el dispositivo B. Se produce una corriente de producto estéril, libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado (el "aislado de producto") y sale de forma continua del dispositivo por su salida (414). Mediante el uso de la bomba (101) del sistema de eliminación de partículas (100) estéril continuo, se bombea la cosecha de forma continua a través del conjunto de filtración (103) al caudal de la cosecha de perfusión deseado  $Q_h$  de la fermentación.

La corriente de salida del sistema de filtración continuo, es decir, el fluido de cultivo tisular clarificado (FCTc) entra de forma continua en el vaso de compensación (201).

Cada vez que el vaso de compensación se llena hasta un nivel predefinido, una señal de peso o nivel desencadena automáticamente un ciclo de adsorción/desorción del sistema de concentración/purificación semicontinuo estéril integrado. El material recogido en el vaso de compensación se carga rápidamente sobre la configuración del adsorbente, es decir, en un plazo de 4 horas, preferiblemente en un plazo de 2 horas, y aún más preferiblemente en un plazo de 1 hora o menos, vaciando de este modo el vaso de compensación.

En las presentes realizaciones mostradas en la Figura 3, la recogida del fluido de cultivo tisular (FCTc) libre de partículas continúa en todo momento, en el mismo vaso de compensación pequeño. Por tanto, el volumen en el vaso de compensación pequeño varía entre un valor mínimo y máximo. En otra realización descrita anteriormente en el texto, la colección se cambia hacia delante y hacia atrás entre 2 vasos de compensación idénticos.

Mientras el FCTc se continua recogiendo en el vaso de compensación, el adsorbente cargado se somete a más pasos de un protocolo cromatográfico predefinido, diseñado para desorber el producto diana en forma concentrada, purificada y para preparar el adsorbente para el siguiente ciclo de carga. Por lo tanto, el ciclo global comprende la



carga, lavado, elución, regeneración y reequilibrado, cada uno con uno o más tampones adecuados.

De nuevo, ya que los caudales durante estas etapas pueden ser altas debido a la naturaleza de los adsorbentes de convección, el tiempo total del ciclo se mantiene bajo, es decir, por debajo de 6 horas, preferentemente por debajo de 3 horas y, todavía preferiblemente, por debajo de 1,5 horas. Por lo tanto, el sistema integrado está diseñado para que la configuración del adsorbente está lista para el siguiente ciclo de carga antes de que el vaso de compensación se llene de nuevo, permitiendo así el funcionamiento semicontinuo.

La siguiente Tabla 2 muestra un ejemplo de un procedimiento de uso de una realización presente del dispositivo B para de la invención para el aislamiento del factor de coagulación sanguínea VIII humano recombinante (datos de gran escala mostrados). El procedimiento resultó ser singularmente beneficioso. Los rendimientos y el desempeño de cada ciclo de adsorción/desorción fue similar al discontinuo, con el rendimiento global del producto aumentado en más de 10 % debido al tiempo de residencia inferior del producto y, por tanto, la degradación del producto se minimizó. También se ha demostrado que el mismo procedimiento es muy beneficioso para el aislamiento de variantes de FVIII de ingeniería genética, incluyendo el FVIII con delección del dominio B, que es significativamente diferente del FVIII de longitud completa en tamaño y otras características. Se espera que sea útil para la producción de otras proteínas y biomoléculas también.

El propio protocolo cromatográfico (químicas y secuencia del tampón, los volúmenes y caudales de carga) se puede desarrollar en experimentos de cromatografía discontinuos para cada molécula individual y, a continuación, se puede transferir fácilmente para su uso con realizaciones del dispositivo de la invención.

**Tabla 2**

Ejemplo de procedimiento para usar una realización presente del dispositivo B para el aislamiento continuo de FVIII y variantes del FVIII de la fermentación de perfusión continua	
Parámetro	Diana
Caudal de la cosecha Qh de perfusión continua [1/d]	2000
Vaso de compensación: volumen máximo de trabajo Vs [1]	200
Volumen de carga [volúmenes de la matriz]	600
Volumen de la matriz del adsorbente instalado en el dispositivo B [ml]	260
Caudal de carga [volúmenes de la matriz/min]	12
Volumen de carga [1]	156
Tiempo de carga [min]	50
Tiempo cromatográfico total [h](protocolo que comprende carga, lavado, elución y varias etapas de regeneración/reequilibrado)	1,5
Tiempo de inactividad del adsorbente/ciclo [h]	0,372
Ciclos/periodo de 24 horas	12,8
Tiempo re recolección [h]	1,872
Tiempo medio aproximado de residencia del producto en el dispositivo (tiempo de recolección + tiempo de carga + tiempo de elución)	2,7

Para cada molécula de producto individual, se define un criterio de vida útil para la configuración del adsorbente de convección, por ejemplo, basándose en la presión durante la carga, o la recuperación. Típicamente, se especifica y valida un número máximo de ciclos nmax. Una vez que se ha usado la configuración del adsorbente en operación semicontinua a través de nmax ciclos, se intercambia contra otra configuración del adsorbente idéntica sin comprometer la integridad y la esterilidad del sistema. En las presentes realizaciones, esto se realiza analogía con la configuración de la filtración continua estéril mediante el uso de cualquiera de colectores y conectores estériles, o mediante el uso de soldadores de tubos flexibles desechable y de tubos estériles.

Cuando se utiliza la realización de dispositivo de la invención mostrada en la Figura 3, lado derecho, una corriente estéril de tampón, solución de ajuste del pH, solución estabilizante o agua para inyección se añade de forma continua o de forma intermitente desde un vaso estéril (204) usando una bomba de adición de tampón (203). Por lo tanto, las condiciones del FCTc se pueden ajustar libremente, por ejemplo, en términos de fuerza iónica, pH, adición de estabilizantes, etc.

Beneficios de la invención

Los dispositivos y procedimientos respectivos de la invención del uso de los dispositivos resuelven los problemas de los procedimientos de aislamiento convencionales descritos antes (véanse los antecedentes generales de la

invención).

5 En todas las realizaciones de los dispositivos A y B y los procedimientos respectivos de uso de los dispositivos, el tiempo de residencia del producto en medio potencialmente perjudicial se minimiza de forma única, lo que aumenta significativamente el rendimiento y la calidad de los productos biológicos complejos inherentemente inestables. La capacidad de la planta se puede aumentar y los costes de los productos se pueden reducir.

Además, los dispositivos y procedimientos respectivos eliminan la necesidad de instalaciones con cuartos fríos y vasos refrigerados grandes para el almacenamiento intermedio de grandes volúmenes de cosecha, reduciendo de este modo los costes de inversión en las plantas y la plena realización de la ventaja de compacidad y movilidad de la fermentación de perfusión.

10 Las realizaciones de los dispositivos de la invención y los procedimientos respectivos reducen los costes de mano de obra en comparación con el laborioso procesamiento discontinuo convencional, debido al inherentemente alto grado de automatización. Los dispositivos novedosos permiten un funcionamiento continuo, 24 horas al día, durante largos períodos de tiempo, maximizando el rendimiento volumétrico y la utilización del equipo.

15 Además, los dispositivos de la invención eliminan dificultades logísticas en plantas de uno o varios fermentadores. Las realizaciones pueden procesar el material de uno o múltiples fermentaciones de perfusión continua.

Es importante destacar que, puesto que los nuevos dispositivos y procedimientos permiten la operación completamente estéril, se eliminan las cuestiones de la carga microbiana, así como, las cuestiones de endotoxina, lo que podría no lograrse mediante el procesamiento aséptico, seguido de filtración estéril simple.

20 Además, los dispositivos de la invención permiten evitar o minimizar la necesidad de validación de la limpieza debido a la utilización de productos desechables. A través de las características únicas de los dispositivos y procedimientos de la invención, se pueden usar módulos desechables, así como, tubos, bolsas y conjuntos, cada uno durante un largo período de tiempo (hasta toda la longitud de la campaña), con lo que se reducen drásticamente los costes y se hace uso de productos desechables de gran atractivo desde un punto de vista económico.

25 Las presentes realizaciones de los dispositivos A y B de la invención y los procedimientos respectivos han demostrado ser especialmente útil para la fabricación del factor VIII de coagulación sanguínea recombinante, así como, versiones de FVIII modificados genéticamente, pero sin limitaciones, el FVIII con dominio B delecionado. Sin embargo, claramente se puede esperar que las invenciones sean similarmente útiles para la producción de otras proteínas y moléculas biológicas, en particular complejas proteínas inherentemente inestables, tales como el Factor VII, Factor IX, Factor X y otros.

30 Beneficios del dispositivo A y el respectivo procedimiento

La figura 8 muestra un ejemplo del sorprendente incremento de la capacidad del filtro descubierta para el elemento de eliminación de partículas continuo integrado (100).

35 La Figura 10 muestra una distribución del tiempo de residencia típica y el tiempo medio de residencia del producto en el sistema de UF continua (300) de una realización del dispositivo A de la invención, como se determina mediante adsorción UV de la fracción retenida a 280 nm, con una proteína modelo en condiciones típicas. Como puede verse, el tiempo medio de permanencia del producto en el sistema es de solo aproximadamente 40 minutos. Por lo tanto, el tiempo total de residencia del producto en esta presente realización del dispositivo A, desde la línea de cosecha del fermentador a la fracción retenida concentrada final (aislado) se mantiene en 1-2 horas o menos. Esto es menos de 1/10 del tiempo de residencia de 28 horas o más en un procedimiento de aislamiento discontinuo convencional, en el que el producto (la cosecha) se recoge durante al menos 24 horas (a varios días), después de lo cual el producto se procesa durante, típicamente, al menos 4-10 horas.

40 La Figura 11 muestra una comparación de los rendimientos de aislamiento total resultantes del factor de coagulación sanguínea recombinante (rFVIII) a partir de fermentación de perfusión continua libre de proteínas plasmáticas para un procedimiento de aislamiento discontinuo convencional (filtración discontinua más UF discontinua) y el uso del dispositivo A y el procedimiento respectivo. Como puede verse en la figura, el procedimiento continuo de la invención logra un rendimiento del producto significativamente mayor, que puede conducir a un aumento de las capacidades de fabricación y costes de fabricación reducidos.

45 Durante el procedimiento de la invención del uso del dispositivo A, la presión de transmembrana de la ultrafiltración continua integrada va a aumentar con el tiempo, mientras que el flujo de membrana específico (en litros/hora/m<sup>2</sup>/bar) disminuye a un rendimiento volumétrico constante. Esto es común a todos los procedimientos de ultrafiltración y se debe a efectos como la polarización de la concentración, la formación de gel-capas y el ensuciamiento. Sin embargo, en contraste con la ultrafiltración discontinua, como se puede ver del ejemplo mostrado en la Figura 12, los cambios de presión y flujo específico son extremadamente lentos con el dispositivo A, lo que permite un funcionamiento continuo durante semanas a la vez, antes de que tengan que limpiarse las membranas o reemplazarse. Además, la velocidad de cambio y el rendimiento general del sistema es bastante insensible al producto producido o de la línea celular utilizada en la fermentación de perfusión continua (Figura 12). Por lo tanto, el dispositivo A de la invención y

el procedimiento respectivo también está idealmente adecuado como una plataforma genérica para la producción rápida de varias proteínas, ya que se realiza con firmeza y de manera predecible con diversas proteínas diana de diferentes líneas celulares.

5 Sorprendentemente, los solicitantes descubrieron que los efectos negativos de la formación de gel-capas y el ensuciamiento de hecho, se minimizan tanto con el dispositivo A, que se puede procesar un volumen total mucho más grande por área de ultrafiltro instalado, antes sea necesaria la limpieza o sustitución de los filtros. La Figura 13 muestra el sólido rendimiento del dispositivo A de la invención en una carrera a largo plazo. Después de aproximadamente 25 días, la presión transmembrana pareció, sorprendentemente, estabilizarse en un estado casi estacionario, lo que sugiere un rendimiento aún mayor a largo plazo. El día 27, el caudal de la fracción retenida se duplicó a propósito para analizar el efecto de un rendimiento más alto. Después de 34 días, se realizó a un corto lavado con NaOH 0,5 M estéril, sin abrir el sistema y, por lo tanto, mientras se mantiene la integridad y esterilidad del sistema completo. Después de esto, la PTM se estabilizó de nuevo, o al menos solo aumentó a una tasa extremadamente baja. Después de 70 días de operación continua, estéril, el caudal de reciclado se redujo a propósito a la mitad para analizar el efecto sobre el rendimiento del sistema. Como se esperaba, la PTM comenzó a aumentar con una velocidad algo mayor debido a la transferencia de masa reducida y, por tanto, al aumento de la concentración de pared en la superficie de la membrana. Sin embargo, se realizaron 95 días de operación con éxito y con firmeza ante de apagar el sistema. Se ha procesado un total de cerca de 4.500 litros por m<sup>2</sup> de área de membrana, con mano de obra manual mínima (muestreo diario solamente). En comparación, el procedimiento de ultrafiltración discontinua convencional optimizado para la misma aplicación tiene 45 veces menos capacidad de carga, en aproximadamente 100 l/m<sup>2</sup>, y requiere al menos 1-2 técnicos a tiempo completo.

También sorprendentemente, la selectividad del dispositivo A de la invención, en particular su sistema de ultrafiltración continua integrado (300), resultó ser significativamente más alta que la selectividad de un procedimiento discontinuo convencional. Es bien conocido por los expertos en el campo que en la ultrafiltración discontinua convencional, se forma una membrana secundaria a partir de macromoléculas retenidas durante la etapa inicial del procedimiento (capa de gel), lo que reduce el valor de corte de peso molecular aparente. El resultado es que tanto la molécula diana como las proteínas contaminantes más pequeñas son retenidas, lo que hace que la purificación simultánea importante se prácticamente imposible. Por lo tanto, con la ultrafiltración discontinua convencional rara vez es posible separar las proteínas que están a menos de un factor de 10 de separación, en términos de su peso molecular. embargo, como puede verse en la Figura 14, con el procedimiento de ultrafiltración continua integrada de la invención, es posible ajustar las condiciones para separar de manera eficiente IL-2SA (aproximadamente 16 kDa) y la proteína verde fluorescente GFP (27-30 kDa). Este rendimiento de separación más alto de lo esperado sí permite concentración y purificación simultáneas.

#### Beneficios del dispositivo B y el respectivo procedimiento

La Figura 15 ilustra el rendimiento del dispositivo B de la invención. Usando un adsorbente de convección comercial (Mustang Q, Pall Corporation, 15 módulo de la capa), se han realizado cerca de 100 ciclos de adsorción/desorción consecutivos, de modo que se concentra y purifica una variante de FVIII recombinante a partir de cultivo de perfusión continua. El rendimiento promedio obtenido fue de aproximadamente 95 % (resultados de cálculo de la variación del ensayo), mientras que la presión se mantuvo relativamente constante en todo el número de ciclos realizados. Por lo tanto, se puede especificar que se pueden realizar al menos 100 ciclos consecutivos antes de intercambiar la configuración del adsorbente.

Como se ha demostrado en la descripción detallada del procedimiento de utilización del dispositivo B de la invención, el tiempo medio de residencia total del producto en una realización presente es inferior a 3 horas, antes de que se eluya en forma concentrada, purificada y estabilizada en un tampón apropiado. Esto es significativamente menor que el tiempo de residencia de más de 24 horas en un procedimiento de aislamiento convencional discontinuo realizado una vez al día y, por lo tanto, da lugar a rendimientos significativamente mayores de los productos proteicos inherentemente lábiles. En una realización presente descrita anteriormente, se realizan aproximadamente 13 ciclos al día, lo que significa en el contexto de la Figura 15 que el conjunto de adsorbente semicontinuo tendría que cambiarse solo cada 7-8 días, que se realiza sin comprometer la esterilidad y la continuidad de la operación.

La figura 16 muestra un ejemplo del perfil de UV y conductividad durante un único ciclo de adsorción/desorción típico y el ciclo de regeneración con dispositivo B. Se puede observar que se pueden cargar más de 450 volúmenes de adsorción (CVS), mientras que el producto se eluye en un pico muy afilado. Los contaminantes se eliminan de manera significativa en el flujo continuo durante la fase de carga, así como durante el lavado y raspado (fase de regeneración).

La Figura 17 ilustra el rendimiento de purificación del procedimiento de la invención que comprende adsorción/desorción semicontinua de convección. Se muestra un ejemplo de gel de SDS page de un aislado variante de FVIII. Como puede verse, las fracciones de eluato, que incluyen 95 % de la variante del FVIII cargado (como se determina mediante un ensayo de actividad independiente), contienen significativamente menos proteína que la carga y de este modo se purifican. No hay bandas de degradación adicionales visibles en el eluato (aislado), lo que indica una excelente calidad del producto.

5 En resumen, el dispositivo B de la invención es capaz de lograr un rendimiento de purificación similar a los procedimientos discontinuos comparables, mientras que al mismo tiempo reduce al mínimo las pérdidas de rendimiento para los productos proteicos inherentemente inestables, así como los problemas de calidad del producto, debido a la minimización del tiempo de residencia del producto. Al mismo tiempo, los costes derivados de la mano de obra se reducen drásticamente debido al elevado grado de automatización inherente al procedimiento de la invención, lo que requiere una mínima intervención del técnico.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para la purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla de fluidos de cultivo tisular heterogénea, que comprende:

- 5 (a) producir mediante un procedimiento de fermentación de perfusión continua una mezcla de fluidos de cultivo tisular heterogénea que contiene una proteína de interés;
- (b) transferir la mezcla de fluidos de cultivo tisular a un procedimiento de eliminación de partículas continuo integrado con el sistema de fermentación de perfusión continua;
- (c) eliminar los contaminantes particulados del fluido de cultivo tisular en el procedimiento de eliminación de partículas continuo para producir un fluido de cultivo tisular clarificado que contiene la proteína de interés;
- 10 (d) transferir el fluido de cultivo tisular clarificado a un vaso de compensación integrado con el procedimiento de eliminación de partículas continuo;
- (e) transferir de forma intermitente el fluido de cultivo tisular clarificado a un procedimiento de purificación integrado con el vaso de compensación; y
- 15 (f) purificar la proteína de interés a partir del fluido de cultivo tisular clarificado en el procedimiento de purificación para producir un aislado de producto estéril, sin partículas, concentrado y parcialmente purificado que contiene la proteína de interés;

en el que el caudal específico de la mezcla a través del procedimiento de fermentación de perfusión continua y el procedimiento de eliminación de partículas continuo se mantiene sustancialmente constante.

20 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento de purificación es adsorción/desorción por convección.

3. Un aparato para separar una proteína de interés a partir de una corriente de fluido de cultivo tisular, que comprende:

- 25 (a) un sistema de fermentación de perfusión continua;
- (b) un sistema de eliminación de partículas continuo integrado con el sistema de fermentación de perfusión; y
- (c) un sistema de purificación intermitente integrado con el sistema de eliminación de partículas; en el que el aparato se mantiene en condiciones estériles.

4. El aparato de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende:

- 30 (a) un sistema de fermentación de perfusión adaptado para producir de forma continua un fluido de cultivo tisular que contiene una proteína de interés;
- (b) un sistema de eliminación de partículas integrado con y adaptado para recibir de forma continua el fluido de cultivo tisular del reactor y para producir de forma continua un fluido de cultivo tisular clarificado;
- (c) un vaso de compensación integrado con y adaptado para recibir de forma continua el fluido de cultivo tisular clarificado del sistema de eliminación de partículas y liberar de forma semicontinua el fluido de cultivo tisular clarificado, y
- 35 (d) un sistema de purificación integrado con y adaptado para recibir de forma semicontinua el fluido de cultivo tisular clarificado desde el vaso de compensación; en el que el aparato está adaptado para mantener condiciones de esterilidad.

5. El aparato de la reivindicación 3, en el que el sistema de purificación comprende un sistema de adsorción/desorción por convección.

40

Fig. 1

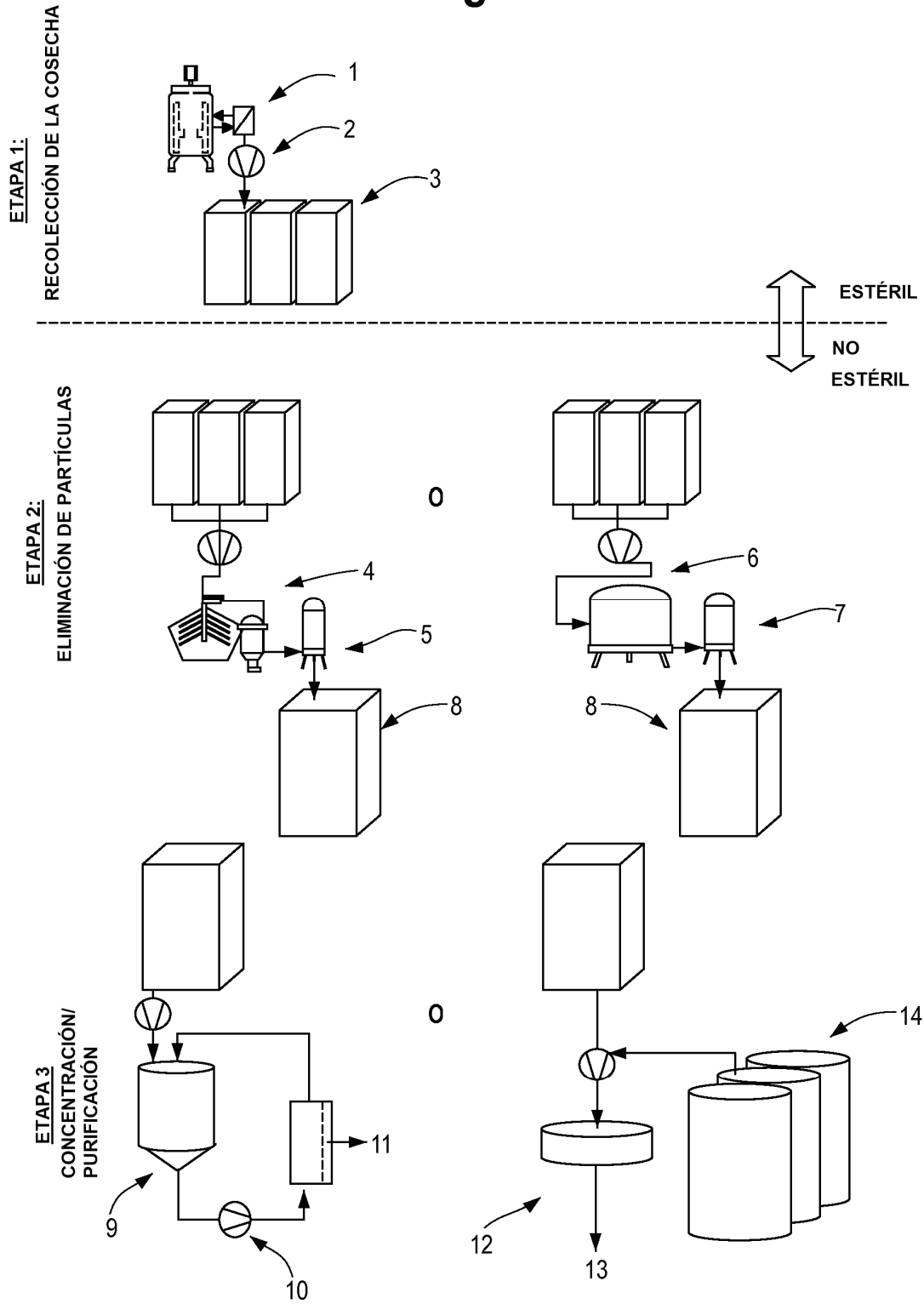


Fig. 2

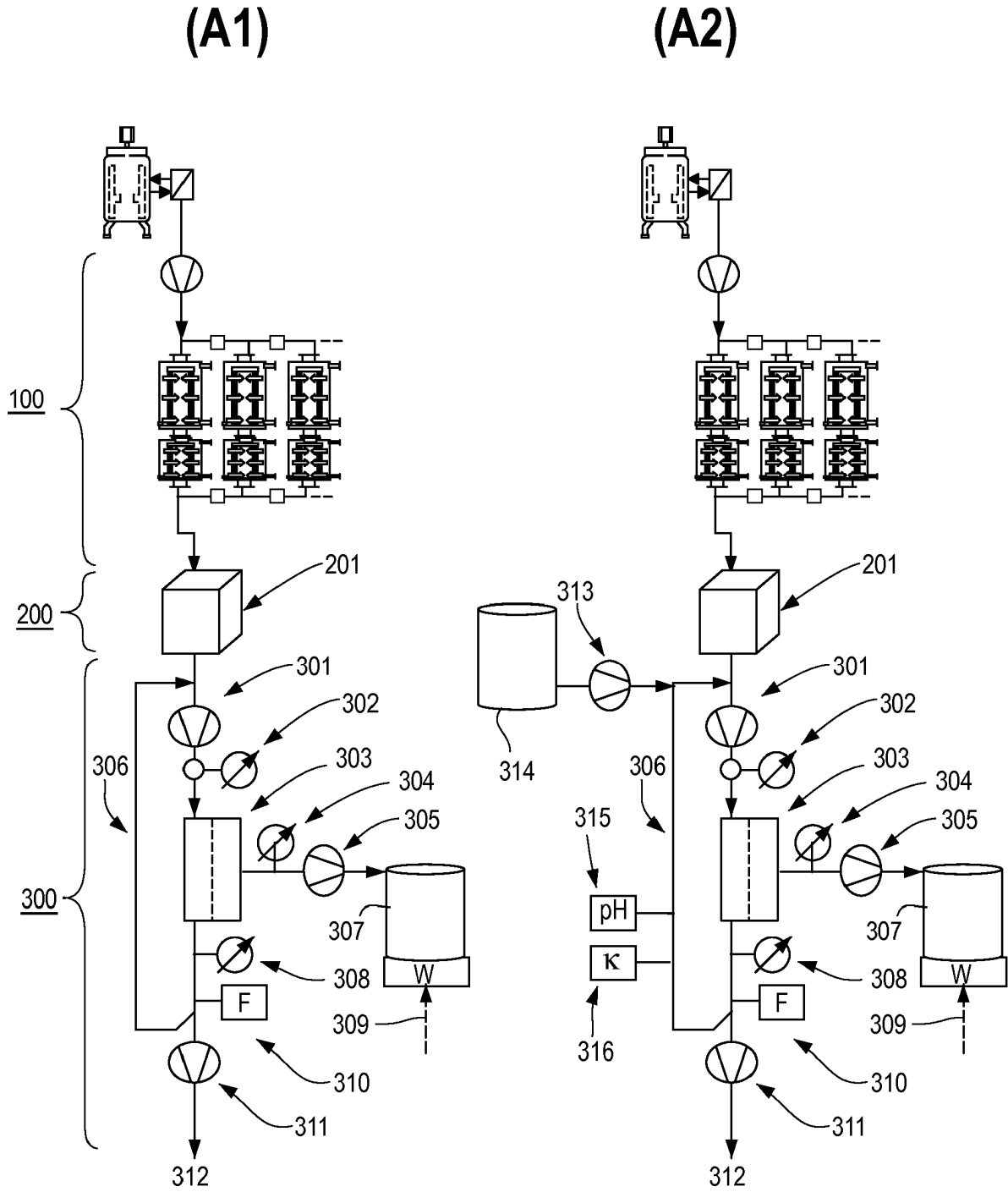


Fig. 3

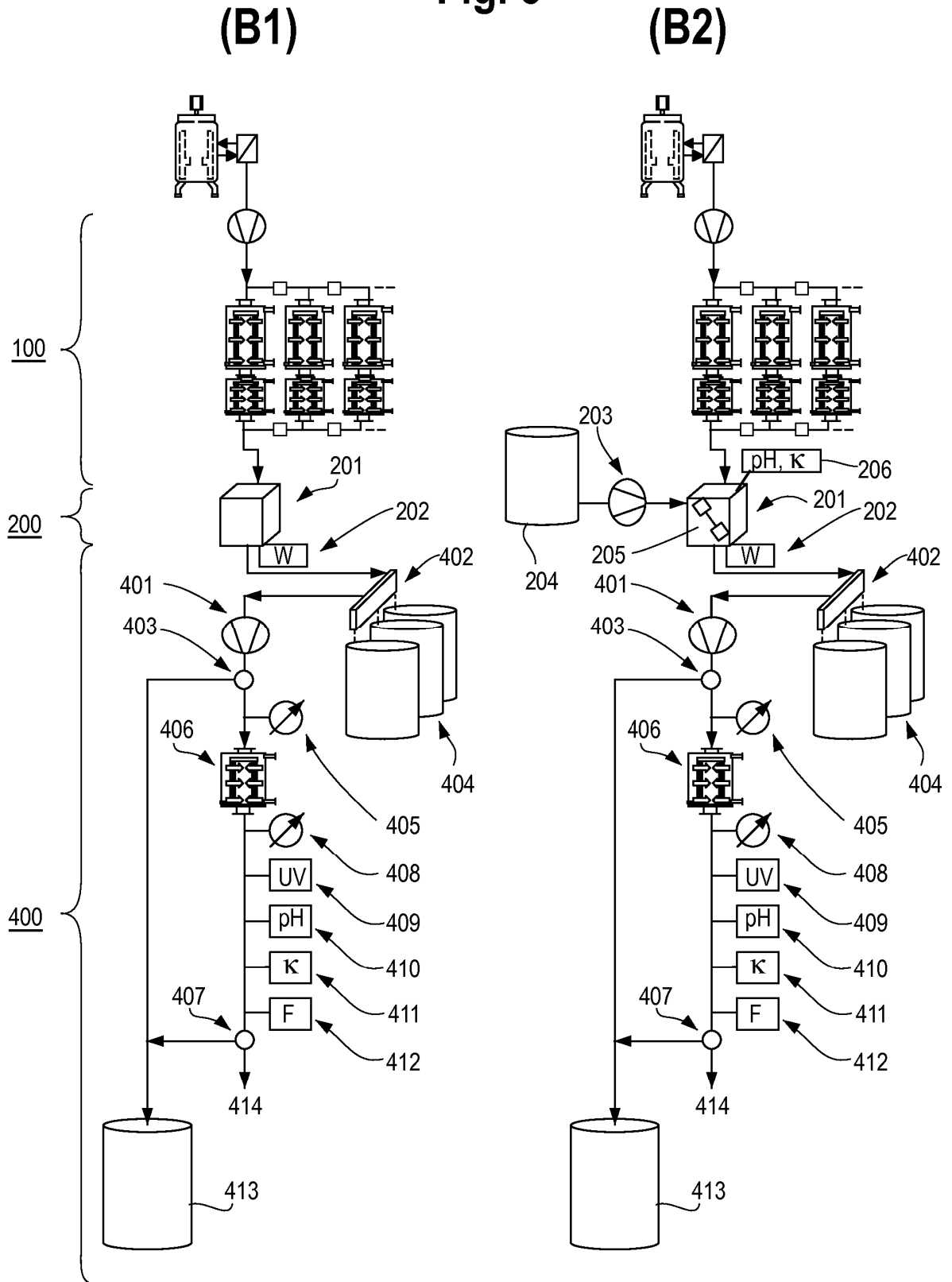
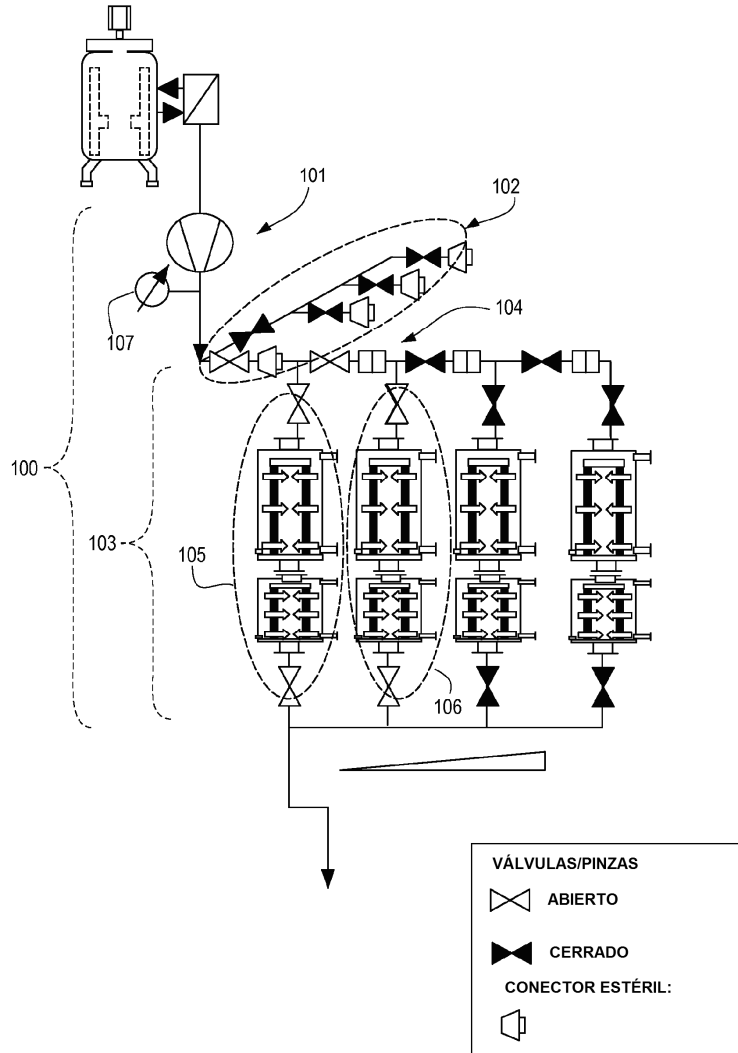
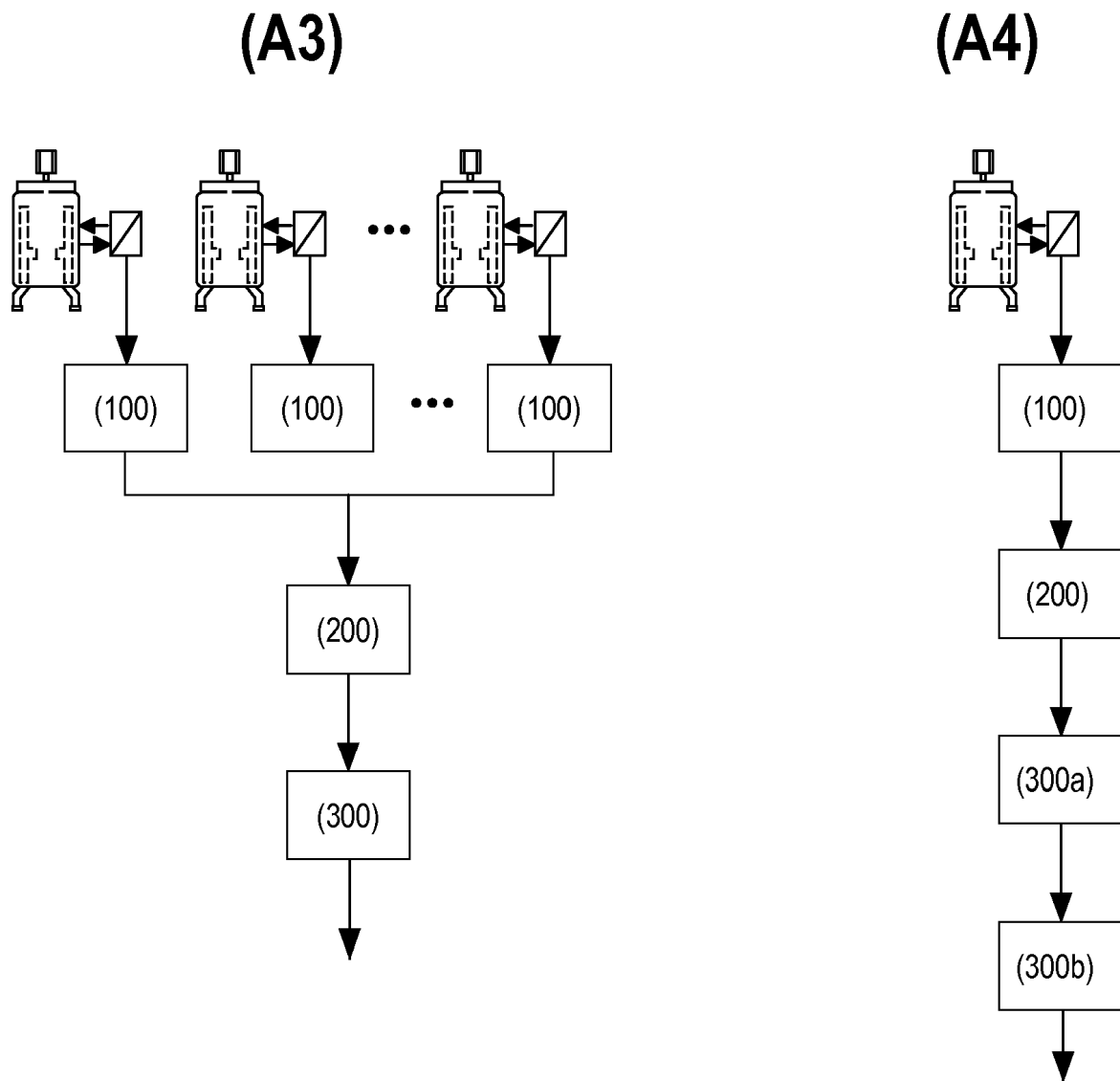




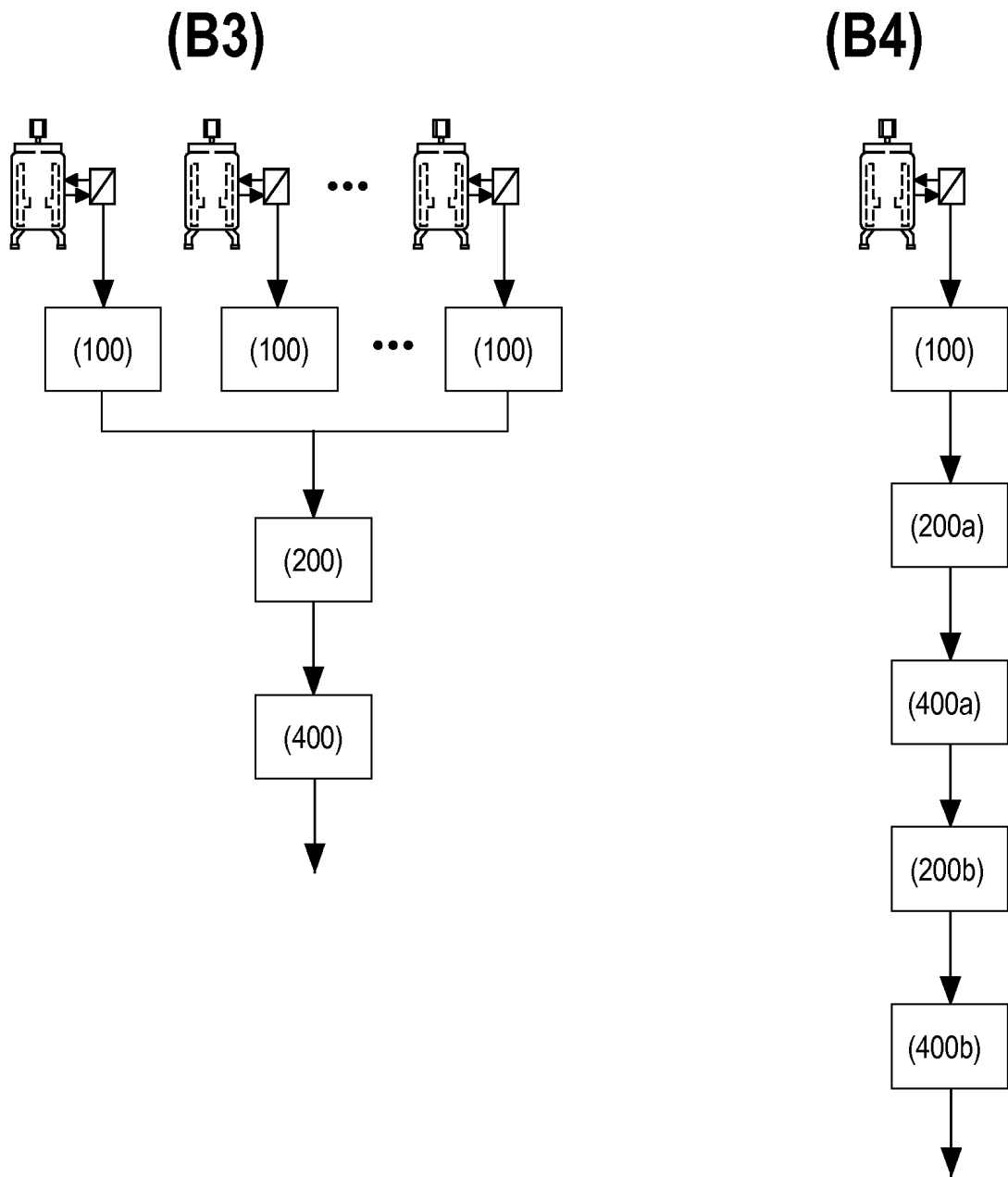
Fig. 4



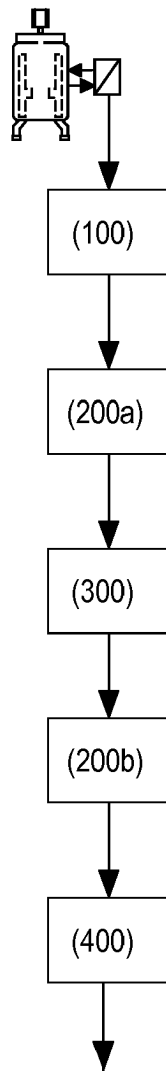
**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**

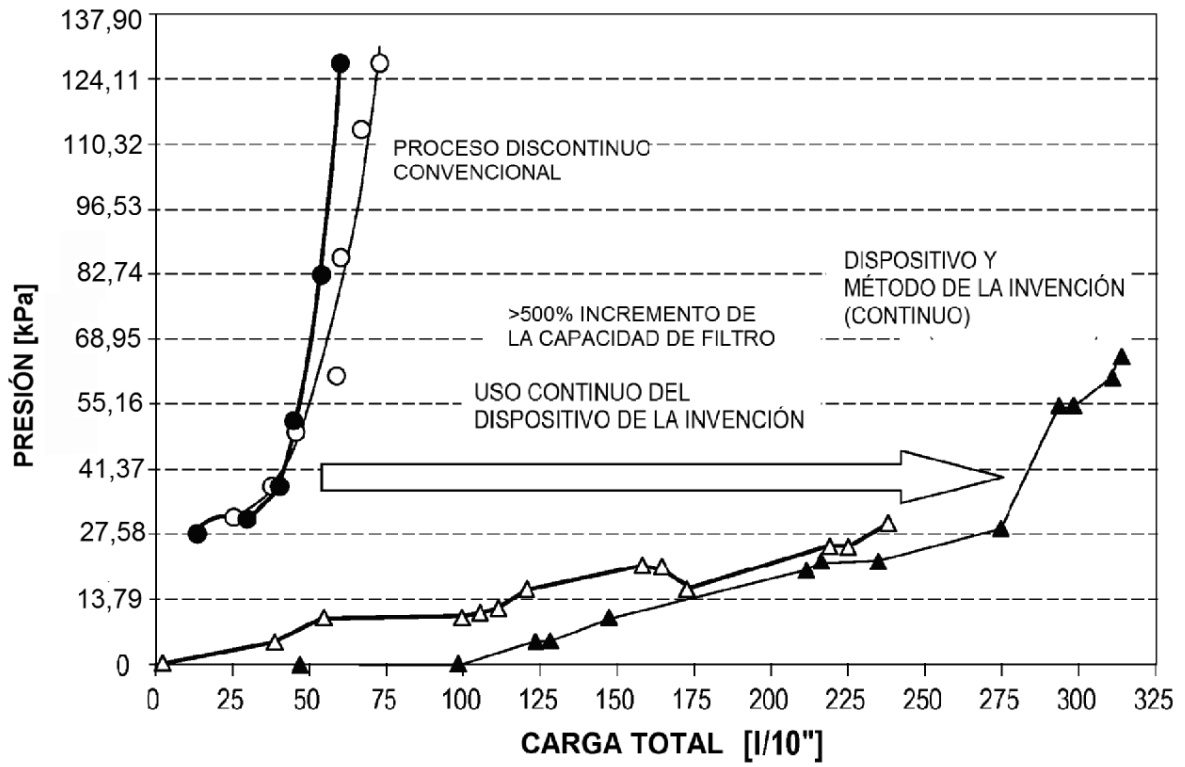
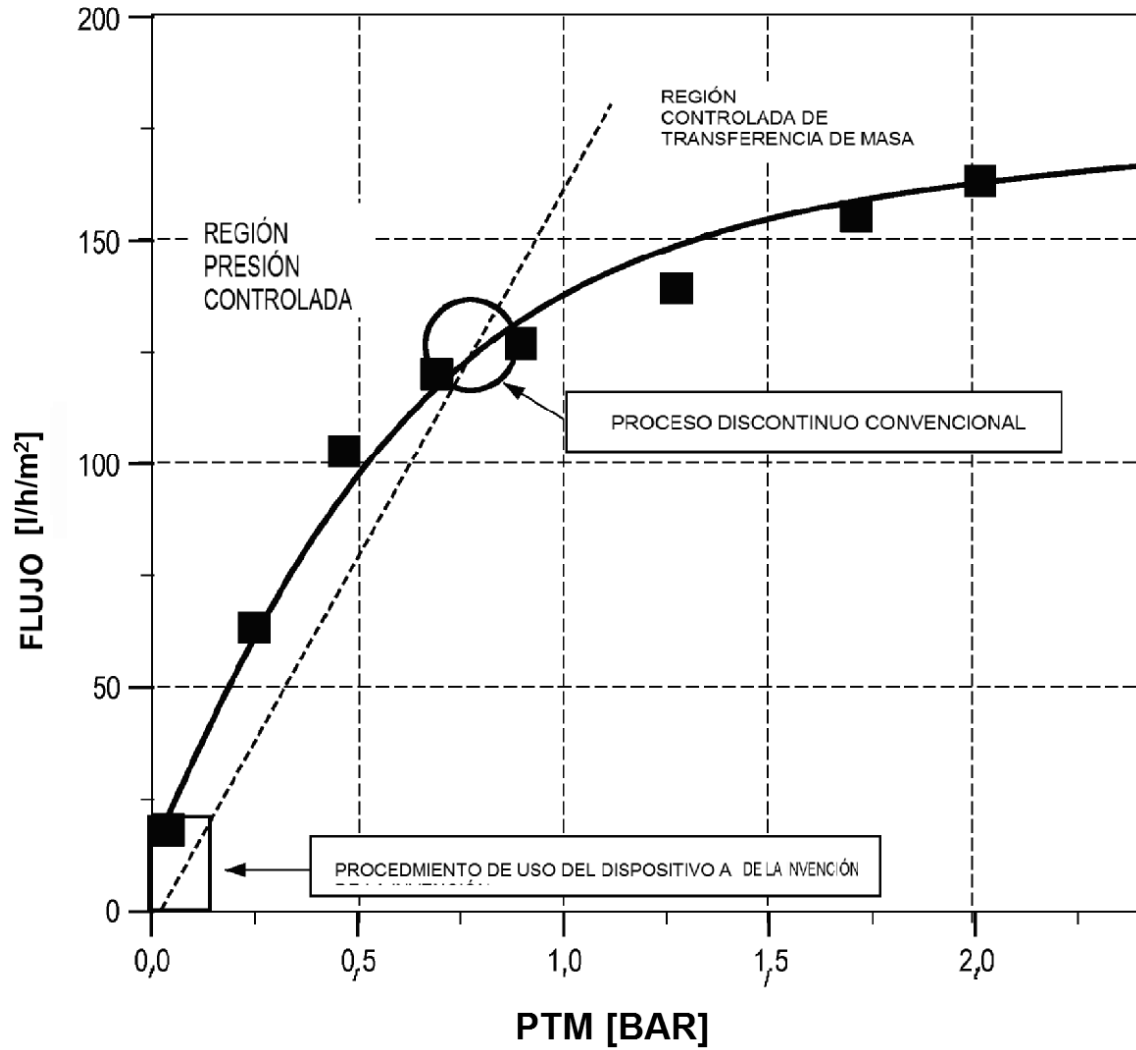
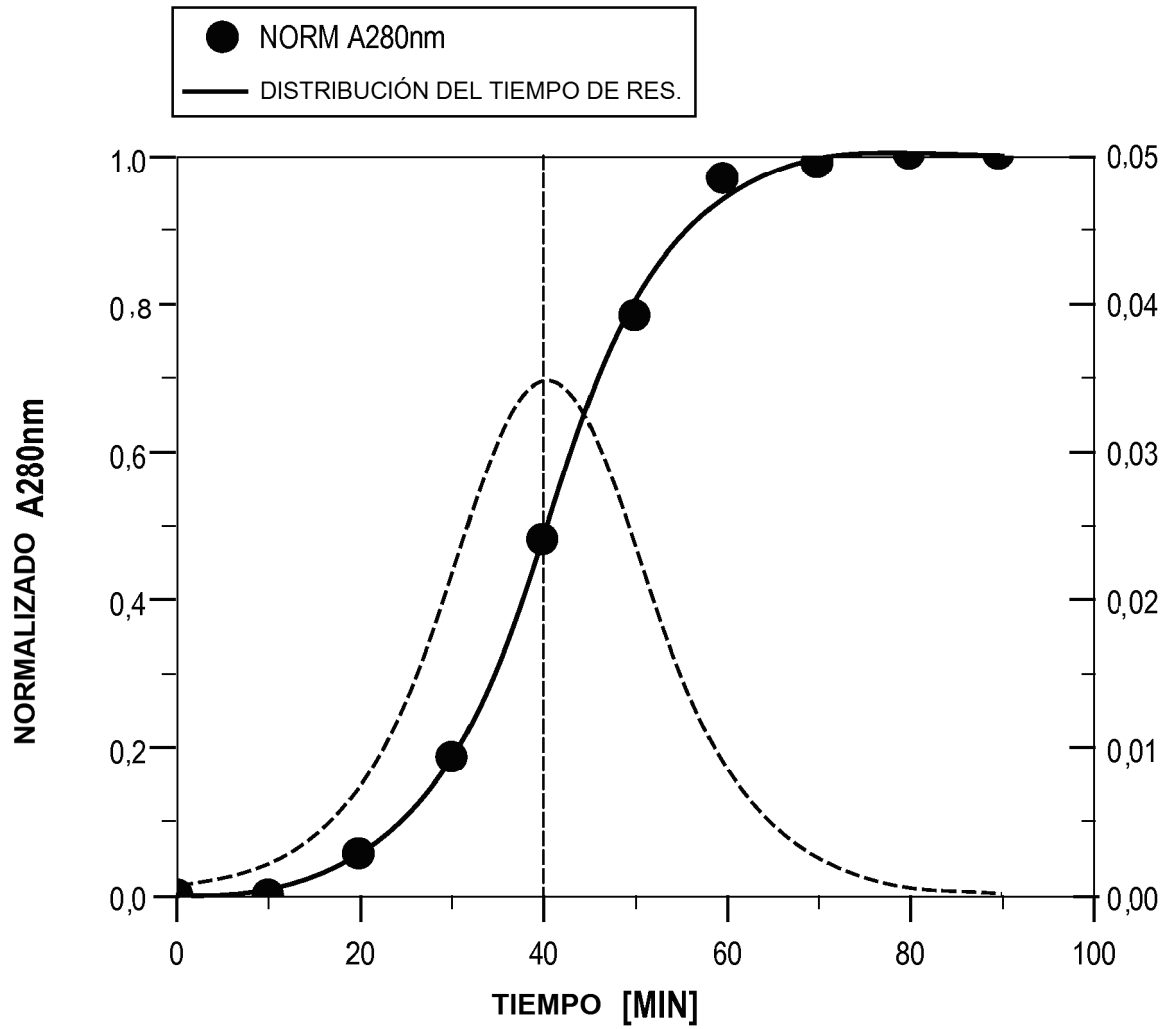


Fig. 9



**Fig. 10**



**Fig. 11**

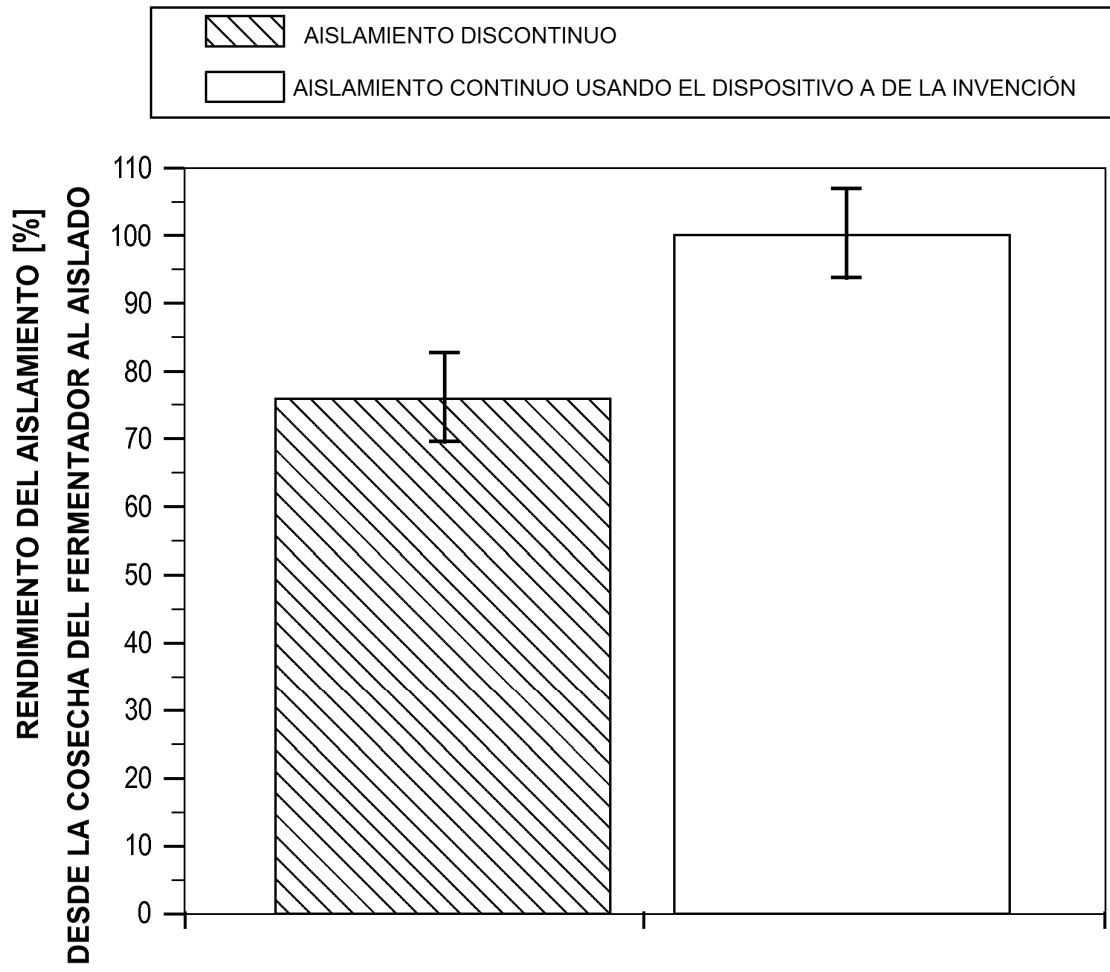




Fig. 12

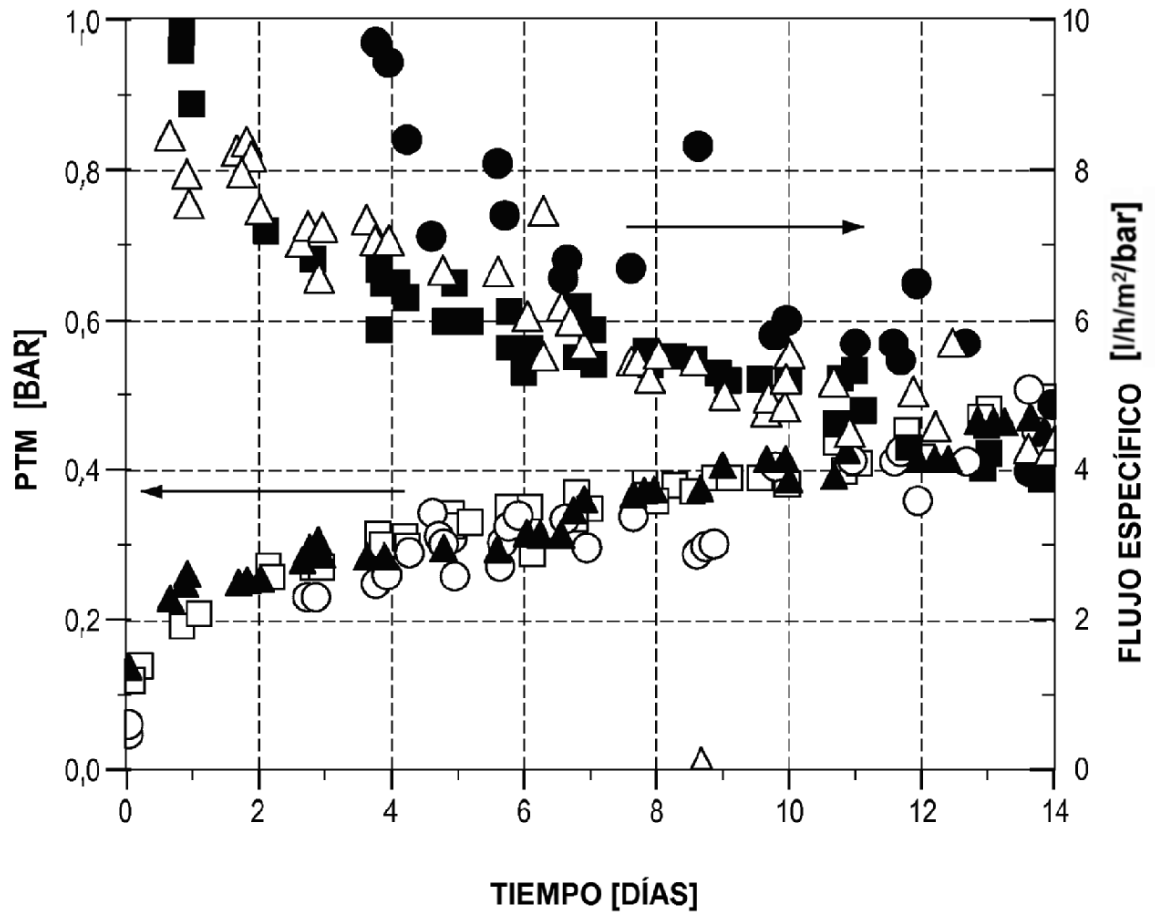


Fig. 13

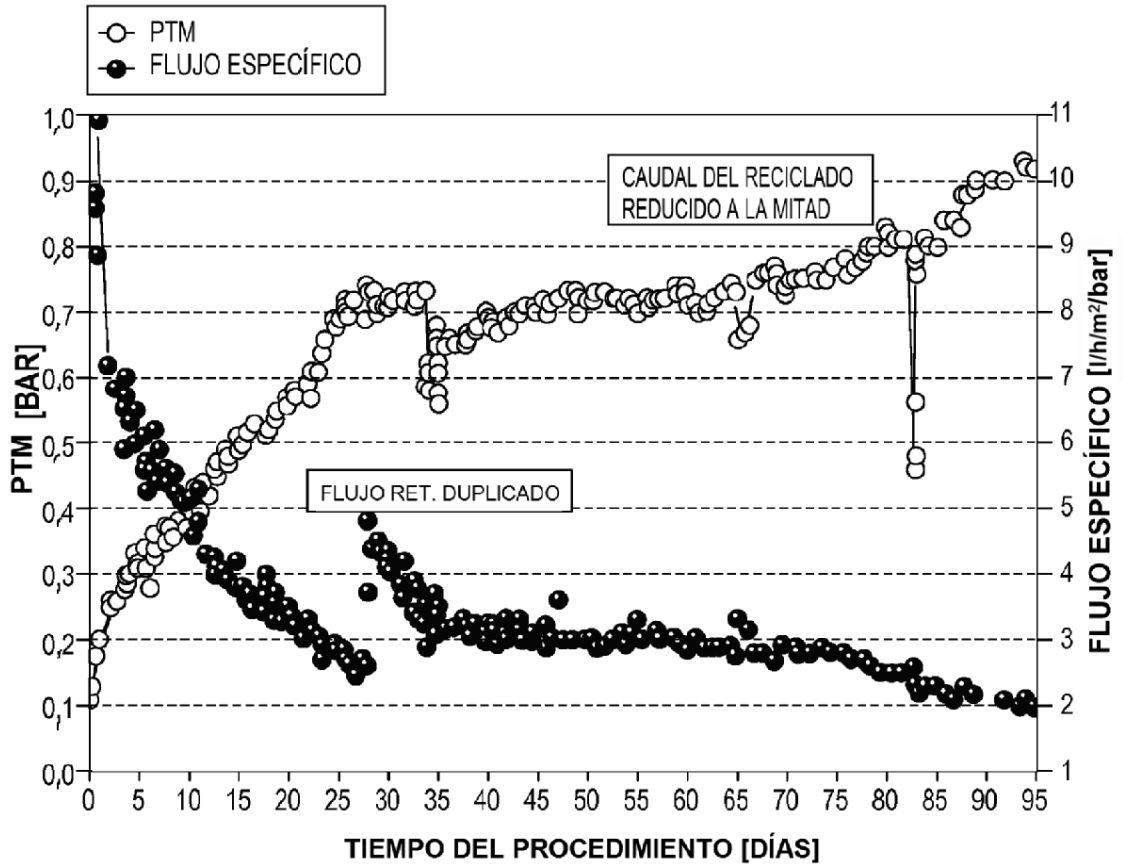


Fig. 14

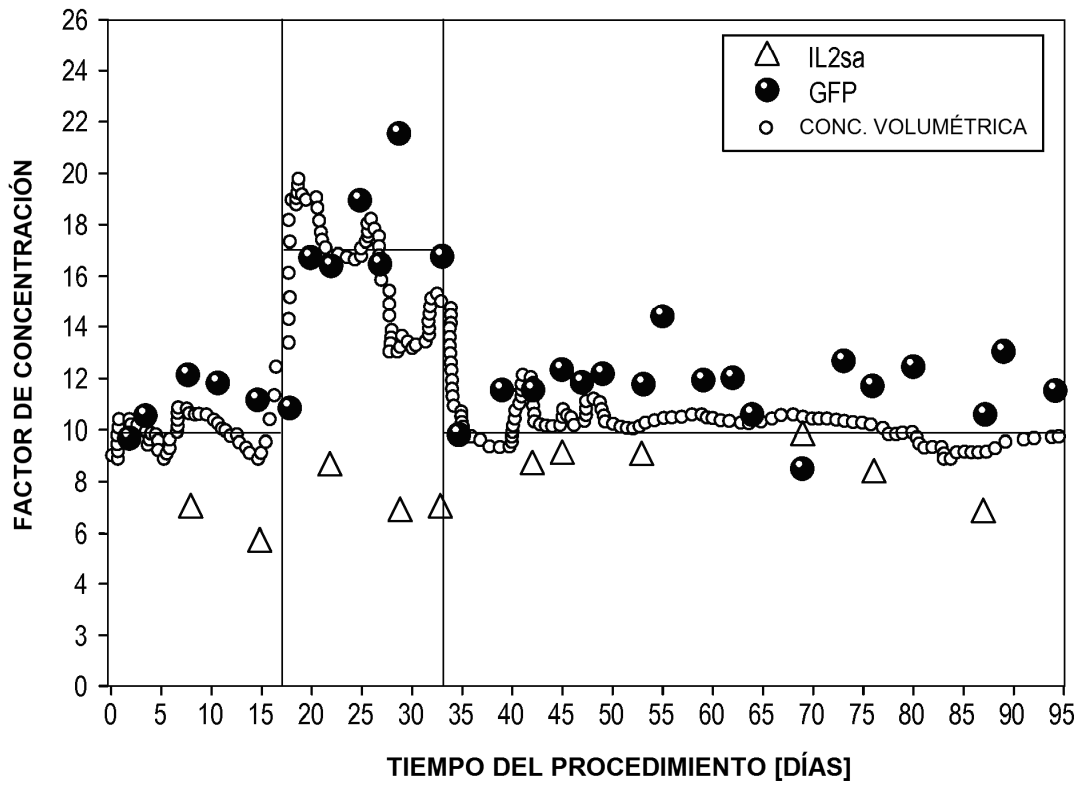


Fig. 15

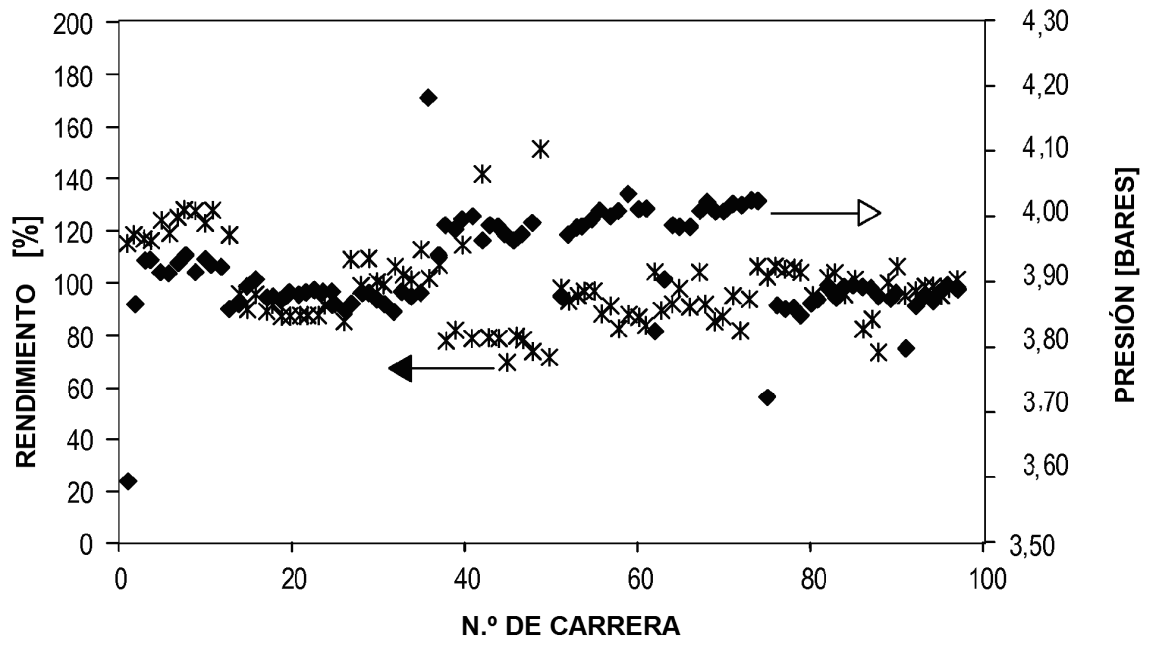
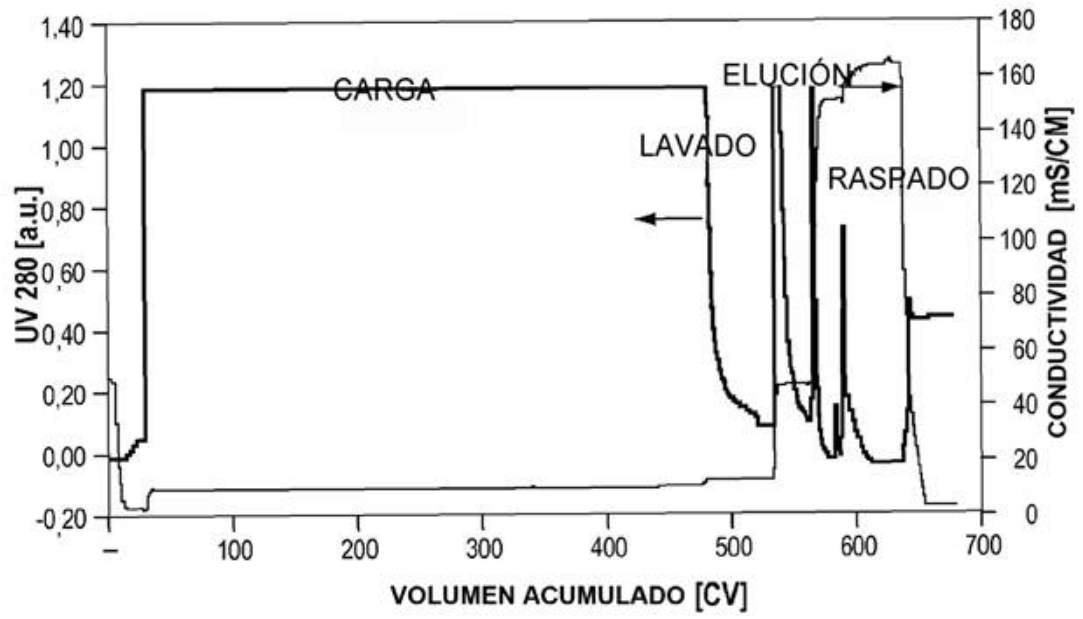


Fig. 16



**Fig. 17**

