

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 190**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/34**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2013 PCT/EP2013/072511**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14067898**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2013 E 13794828 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2914612**

54 Título: **Purificación de polipéptidos utilizando ultrafiltración de flujo tangencial de dos fases**

30 Prioridad:

**30.10.2012 EP 12190682**

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

**27.03.2019**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel , CH**

72 Inventor/es:

**BECKER, PETER y  
NEUMANN, SEBASTIAN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 706 190 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**

Purificación de polipéptidos utilizando ultrafiltración de flujo tangencial de dos fases

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a procedimientos para la separación de una molécula de interés de una solución que contiene la molécula utilizando ultrafiltración de flujo tangencial de dos fases ("TFF"). En particular, los procedimientos de la invención se refieren al procesamiento de corrientes de alimentación en bruto, tales como sobrenadante de cultivo celular acondicionado, para reducir drásticamente los niveles de contaminantes y/o impurezas antes de las operaciones unitarias de refinamiento subsiguientes, es decir, corriente abajo. Los procedimientos de la invención se pueden usar en el procesamiento de una corriente de alimentación en bruto de sistemas de producción biológica tales como fermentación u otro proceso de cultivo celular, y pueden eliminar además la necesidad de procesos de precipitación de impurezas que requiere mucho tiempo (por ejemplo, impulsada por pH) y/o de filtración de precipitados antes de procesos corriente abajo que son sensibles a altas cargas de impurezas, tales como las operaciones unitarias cromatográficas. El proceso de TFF de dos fases divulgado combina al menos dos operaciones unitarias de TFF que se pueden realizar de forma ventajosa a un pH que corresponde o es aproximadamente igual al del pH de la corriente de alimentación, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo celular, típicamente un pH de  $7,5 \pm 1,0$ . El uso de las operaciones unitarias de TFF para complementar, mejorar o reemplazar procesos tradicionales para la purificación de proteínas de interés para una corriente de alimentación puede representar un ahorro significativo en los costes de procesamiento tanto directos como indirectos. por ejemplo, además del ahorro indirecto al eliminar los procesos de precipitación y de filtración de precipitados, la reducción de las cargas de impurezas efectuada por las operaciones unitarias de TFF de dos fases puede dar como resultado un ahorro indirecto al mejorar el rendimiento de la columna corriente abajo, por ejemplo, la separación cromatográfica, la capacidad de unión dinámica, la vida útil operativa y/o una reducción del tamaño de columna requerido. En modos de realización particulares, los procedimientos de la invención se usan en procesos para la purificación de moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, anticuerpos, cuyos procesos carecen de etapas de purificación por afinidad, por ejemplo, purificación por cromatografía de afinidad con proteína A.

**30 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a procedimientos de separación y/o purificación de moléculas de interés, en particular, biomoléculas (por ejemplo, proteínas), a partir de soluciones en bruto y/o de producción que contienen las moléculas. A medida que avanza el campo de la biotecnología, el procesamiento económico de grandes cantidades de biomoléculas a partir de soluciones de producción en bruto se ha vuelto cada vez más relevante. En particular, los aspectos económicos de la producción y el procesamiento pueden desempeñar un papel determinante en las decisiones relacionadas con el desarrollo y la fabricación de biomoléculas y/o productos farmacéuticos, incluidas enzimas, anticuerpos y otras proteínas y péptidos especiales. Para la producción de la mayoría de dichas biomoléculas (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, anticuerpos), el uso de técnicas de ADN recombinante se ha convertido en el procedimiento de producción preferido. Usando dichos procedimientos, se pueden expresar grandes cantidades de biomoléculas deseadas en una variedad de sistemas biológicos. Dichos sistemas, incluidos sistemas basados en células (tales como cultivos de bacterias, levaduras, y células de insectos y de mamíferos (por ejemplo, que tienen expresión endógena de la proteína de interés o cultivos de células transgénicas)), animales transgénicos y plantas transgénicas. Las vías biomoleculares de los sistemas de cultivo celular o sistemas *in vivo* también se han reducido a componentes esenciales para la implementación de sistemas de producción *in vitro*. Sin embargo, con estos sistemas de producción, la industria biofarmacéutica se enfrenta al desafío paralelo de desarrollar sistemas mejorados o novedosos para la recuperación de la biomolécula deseada (por ejemplo, proteína) de las soluciones de producción en bruto o los materiales de producción. Las soluciones de producción en bruto incluyen medios de cultivo celular acondicionados, cultivos celulares acondicionados homogeneizados/lisados clarificados, fluidos corporales de animales transgénicos (por ejemplo, sangre, suero, leche y orina) y soluciones de producción *in vitro* que incluyen materiales de partida y componentes además de la biomolécula. de elección. Los procedimientos de recuperación no solo deben dar como resultado que el producto recuperado cumpla los estándares gubernamentales de pureza y seguridad, sino que también deben ser económicamente viables.

Los procesos de purificación particularmente ventajosos para el aislamiento de biomoléculas a partir de soluciones de producción en bruto incluyen típicamente procesos de cromatografía basados en afinidad y/u operaciones unitarias. La cromatografía basada en afinidad separa las biomoléculas en función de la interacción específica de la biomolécula de interés con un resto de unión que está inmovilizado en un sustrato sólido, como una matriz o un gel. Por tanto, la biomolécula de interés se une al sustrato (típicamente contenido dentro de una columna), mientras que los contaminantes y otros componentes no deseados de la corriente de alimentación fluyen a través del sistema. La biomolécula se eluye a continuación del resto de unión y/o columna y se recoge. En consecuencia, las columnas de cromatografía de afinidad son altamente específicas y pueden producir productos muy puros. Con respecto a la purificación de anticuerpos, por ejemplo, a partir de medios de cultivo celular, el resto de unión usado más a menudo para la cromatografía de afinidad es la proteína A. La cromatografía de afinidad con proteína A es altamente selectiva para anticuerpos y puede dar lugar a una pureza de producto de más de un 95 % a partir de una muestra de entrada tal como un medio de cultivo celular acondicionado.

Aunque la cromatografía de afinidad es una potente etapa de captura y purificación, el uso de restos de bioafinidad (también conocidos en la técnica como ligandos de bioafinidad) que se unen a las biomoléculas deseadas también se asocia con altos costes de procesamiento. por ejemplo, los ligandos de bioafinidad (que normalmente son biomoléculas en sí mismos), por ejemplo, la proteína A, cuestan de 7 a 15 veces más que otros materiales de cromatografía (véase Gottschalk, *Process Scale Purification of Antibodies* (John Wiley & Sons, 1.<sup>a</sup> ed., 2009), capítulo 5.3.1). Además, los ligandos de bioafinidad están sujetos a lixiviación del sustrato y la columna. Esto no solo acorta significativamente la vida útil de la columna con respecto a una, que usa, por ejemplo, membranas de filtración, sino que los ligandos lixivados tienen el potencial de desnaturalizarse y pueden inducir la formación de agregados en la molécula de interés. Además, muchos ligandos de bioafinidad, tal como la proteína A, se consideran/considerarían una toxina, lo que requiere que la corriente de producto se controle continuamente para detectar su presencia. Por tanto, el uso de ligandos de bioafinidad representa un desembolso significativo no solo de los costes directos, tal como para los materiales de la propia columna y el aumento de los programas de reemplazo, sino también de los costes indirectos asociados con el mantenimiento del proceso, la monitorización y las posibles operaciones unitarias adicionales (por ejemplo, requisitos para la filtración de precipitados/agregados y/o reprocesamiento). Por lo tanto, las columnas de bioafinidad, su mantenimiento y su monitorización pueden representar los costes más significativos en cualquier esquema de purificación y pueden ser difíciles de integrar de una manera rentable en las operaciones industriales.

En vista de los altos costes asociados con el uso de ligandos de bioafinidad, se han explorado varias alternativas para complementar o mejorar los procedimientos de cromatografía de afinidad, incluyendo los ligandos de afinidad sintéticos y las resinas de modo mixto (véase Gottschalk 2009, capítulo 5.3.2). Además, también se han investigado procedimientos de procesamiento/purificación que eliminan completamente la operación unitaria de afinidad. Dichos procedimientos incluyen filtración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel y combinaciones de los mismos. por ejemplo, una evaluación sistemática de un proceso de cromatografía en tres etapas para la purificación de un anticuerpo que no incluye la cromatografía con proteína A ha sido publicada por Follmann et al., *J. Chromatog.* 1024(2004), 79-85.

Algunos de los procesos de purificación biomolecular investigados más extensamente para complementar o sustituir el procesamiento basado en afinidad son aquellos que comprenden procesos de cromatografía de intercambio iónico. En particular, la cromatografía de intercambio catiónico ("CEX") se ha investigado en varios esquemas de purificación de proteínas, tanto conjuntamente con como en sustitución de operaciones unitarias basadas en afinidad (véase, por ejemplo, Arunakumari et al., *Adv. Process Chromatog. (Supp. BioPharm Int.)* (2007), 36-40; Arunakumari et al, *BioPharm. Int. Supp.* 2 de marzo de 2009; Wang et al., *BioPharm. Int. Supp.* 2 de marzo de 2008; Gottschalk 2009, capítulo 5.3.3; Cacciuttolo, *Pharmaceutical Process Scale-Up* (CRC Press, 2.<sup>a</sup> ed. (2006), capítulo 5; Morrow, *Gen. Eng. Biotech. News* 28 (2008; disponible solo en línea)). A pesar de su promesa, la cromatografía de intercambio iónico no ha sustituido completamente la cromatografía de afinidad, pero se ha adaptado para servir como un proceso de purificación adicional junto con la cromatografía de afinidad en procesos de purificación industrial frecuentes. Sin embargo, en los procesos de cromatografía, la composición del material de carga (por ejemplo, la corriente de producto introducida en el proceso/unidad de operación/columna) es crítica para el correcto funcionamiento de la columna. Por lo tanto, en los procedimientos de purificación que tienen procesos de cromatografía/operaciones unitarias, el procesamiento del material de carga antes del proceso cromatográfico es una primera etapa esencial. Por ejemplo, antes de la operación de la unidad cromatográfica, la corriente de alimentación (que contiene la molécula de interés) normalmente se debe ajustar a un pH adecuado, dependiendo del tamponamiento y la conductividad del punto isoelectrónico particular de la molécula de interés y los parámetros de columna particulares. Por tanto, no es solo el proceso cromatográfico particular, sino también la composición de la corriente de alimentación lo que determina qué modificaciones de la corriente de alimentación son necesarias. Las variaciones en la corriente de alimentación pueden, por tanto, requerir una modificación significativa de las operaciones unitarias y el procesamiento de la corriente de alimentación corriente arriba del proceso de cromatografía iónica.

El procesamiento/ajuste de los parámetros de la corriente de alimentación a menudo se realiza mediante diafiltración/filtración de flujo tangencial ("TFF"). Durante esta etapa del procesamiento, el disolvente de la corriente de alimentación se intercambia gradualmente por diafiltración durante la TFF con un tampón apropiado para la operación cromatográfica particular. Por ejemplo, con respecto a la purificación de anticuerpos usando CEX, la mayoría de los procesos ajustan la corriente de alimentación antes de CEX a un pH de aproximadamente 5 a 7 con baja conductividad porque muchos anticuerpos presentan puntos isoelectrónicos mayores de 7. Sin embargo, cuando la corriente de alimentación es un medio celular acondicionado (por ejemplo, un sobrenadante o un cultivo celular homogeneizado), el ajuste del pH de la corriente de alimentación por debajo de un valor neutro durante el intercambio de tampón a menudo da como resultado la precipitación de contaminantes, tal como ADN de la célula huésped ("HCDNA") y proteínas de la célula huésped ("HCP") (véase, por ejemplo, Gottschalk 2009, capítulo 5.3.3; Wang et al, 2008).

El evento de precipitación tiene una importancia económica significativa, no solo porque obliga a añadir al menos otra operación en una unidad (para eliminar los precipitados), sino también porque los procesos de precipitación pueden tener un impacto negativo en la propia operación de la unidad de intercambio de tampón (por ejemplo, durante la operación, la columna de diafiltración/TFF se puede obstruir con el precipitado). Por tanto, el procesamiento de

proteínas a partir de cultivos celulares recombinantes utilizando procesos cromatográficos normalmente requiere el uso de costosas operaciones unitarias, tal como tanques de precipitación y/o unidades de filtración (véase, por ejemplo, Wang et al, 2009).

5 Por lo tanto, a pesar de la promesa de la cromatografía de intercambio iónico, pocos han demostrado viabilidad en el entorno industrial para sustituir completamente las operaciones unitarias basadas en afinidad, y la mayoría de los procesos de producción comercial de productos biofarmacéuticos retienen una etapa de purificación por afinidad junto con una operación unitaria de intercambio iónico. Sin embargo, como se detalla anteriormente, estas múltiples operaciones unitarias rara vez son compatibles, a menudo requieren una modificación significativa de los parámetros del tampón que añaden coste y tiempo a los esquemas de purificación. En consecuencia, existe la necesidad de un desarrollo adicional de procesos de purificación para biomoléculas producidas de forma recombinante, por ejemplo, proteínas, que permitan que el potencial de purificación ofrecido por procesos no basados en afinidad se realice mejor de una manera más uniforme. En particular, hay una necesidad de etapas de procesamiento que sean compatibles con una amplia gama de flujos de alimentación; que sean capaces de reducir significativamente las cargas de contaminantes, en particular, proteínas de células huésped (HCP) y/o ADN de células huésped (HCDNA) contaminantes; y que sean compatibles con otras operaciones unitarias, tal como cromatografía basada en afinidad y con procesos corriente abajo tal como cromatografía de intercambio iónico.

## 20 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos para la separación de una molécula de interés de una solución de cultivo celular que contiene la molécula utilizando ultrafiltración de flujo tangencial de dos fases ("TFF"). Los procedimientos de TFF de dos fases descritos en el presente documento reducen sustancialmente los niveles de contaminantes y/o impurezas en una corriente de alimentación de producto, y son particularmente útiles como procesos corriente arriba implementados antes de las operaciones de la unidad de purificación y aislamiento estándar que se pueden usar para llevar la corriente de producto a la formulación y/o pureza final, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico. Los procedimientos de TFF de dos fases descritos en el presente documento se prevén particularmente para complementar y, por tanto, ser compatibles con los procedimientos de purificación estándar tales como operaciones unitarias de cromatografía basada en afinidad y cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, la invención también abarca procedimientos en los que los procedimientos de TFF de dos fases divulgados sustituyen a las operaciones unitarias de cromatografía basada en afinidad en la producción y/o purificación de una molécula de interés. Los procedimientos de la invención se pueden usar en el procesamiento de una corriente de alimentación en bruto (es decir, una solución de cultivo celular) de cualquier sistema de cultivo celular, incluyendo fermentaciones u otros procesos de cultivo celular para reducir sustancialmente impurezas o contaminantes tales como proteínas de células huésped (HCP) y ADN de células huésped (HCDNA), cuyas corrientes de salida se pueden procesar a continuación utilizando procedimientos de purificación estándar, con o sin operaciones unitarias de cromatografía basada en afinidad. La reducción sustancial de contaminantes y/o impurezas de la corriente de alimentación (es decir, del sobrenadante de cultivo celular) ofrecida por el uso de los procedimientos de TFF de dos fases divulgados elimina la necesidad de operaciones unitarias de purificación estándar, tal como, por ejemplo, precipitación de impurezas y/o filtración del precipitado impulsadas por el pH (generalmente requeridas antes de la cromatografía de intercambio iónico debido a los cambios requeridos en la composición del tampón) y/o puede mejorar la eficiencia o incluso eliminar las costosas operaciones unitarias basadas en afinidad. Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento son particularmente útiles como procesos corriente arriba implementados en operaciones unitarias anteriores que son particularmente sensibles a cargas de impurezas tales como operaciones unitarias cromatográficas. Por ejemplo, con respecto al uso de operaciones unitarias cromatográficas corriente abajo, por ejemplo, columnas, la reducción sustancial de la carga contaminante efectuada por los procedimientos de la invención puede actuar para mejorar la separación cromatográfica, mejorar la capacidad de unión dinámica, aumentar la vida útil operativa y/o reducir el tamaño de columna requerido, todo lo cual reduce significativamente los costes tanto directos como indirectos asociados con la producción, procesamiento y purificación de la molécula de interés.

50 En particular, los procedimientos de la presente invención proporcionan la separación de una molécula de interés de una solución de cultivo celular que contiene la molécula usando TFF de dos fases, cuyos procedimientos reducen sustancialmente los niveles de contaminantes y/o impurezas. Los autores de la presente invención han descubierto que un proceso de TFF de dos fases que combina al menos dos operaciones unitarias de TFF (una que procesa la molécula de interés en el retenido y otra que procesa la molécula de interés en el permeado) puede reducir los niveles de contaminantes y/o impurezas en la corriente de producto (es decir, la solución que contiene la molécula de interés durante el procesamiento) en un grado tan sorprendente que la eliminación de contaminantes corriente abajo por medio de un procesamiento estándar (tal como precipitación (en particular, mediada por ajuste del pH), filtración del precipitado y separación basada en afinidad) se puede minimizar o eliminar. En consecuencia, los procedimientos de la presente invención son particularmente útiles en procesos que comprenden procesos cromatográficos corriente abajo, que pueden ser particularmente sensibles a la composición de la corriente de producto. A este respecto, los procedimientos de TFF de dos fases de la presente invención afectan no solo a la reducción sustancial de los niveles de contaminantes y/o impurezas de la corriente de producto, sino que también se pueden usar de forma concurrente para ajustar los parámetros de la corriente del producto, por ejemplo, pH y/o conductividad, de modo que sean compatibles con operaciones unitarias corriente abajo. De esta manera, los procedimientos de la invención son

altamente complementarios de los procesos cromatográficos corriente abajo tales como cromatografía de intercambio catiónico ("CEX") y cromatografía de intercambio aniónico ("AEX").

Los procesos de TFF de dos fases son particularmente adecuados para procesar soluciones de cultivo celular antes de procesos de purificación y aislamiento corriente abajo, por ejemplo, cromatográficos, que se usan para llevar la corriente de producto a la formulación y/o pureza final. El proceso de TFF divulgado en el presente documento se puede realizar de forma ventajosa a un pH que corresponde a o es aproximadamente el de una corriente de producto en bruto/solución de cultivo celular típico de un proceso biológico (por ejemplo, medios de cultivo celular acondicionados, lisados de cultivos celulares, medios de fermentación acondicionados, etc.). Típicamente, los procedimientos de TFF divulgados en el presente documento se llevan a cabo a un pH de  $7,5 \pm 1,0$  o  $7,5 \pm 0,5$ . Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento se pueden combinar con procesos de purificación estándar corriente abajo conocidos en la técnica, tales como purificación por afinidad o, en particular, con procesos de purificación corriente abajo que no se basan en el aislamiento por afinidad, por ejemplo, procesos cromatográficos. En particular, los procedimientos divulgados en el presente documento reducen los niveles de contaminantes de manera que el pH de la corriente de producto se puede modificar corriente abajo, por ejemplo, disminuir a al menos aproximadamente 5, sin precipitación de ningún contaminante restante, tales como proteínas de células huésped (HCP) y/o ADN de células huésped (HCDNA) que puede estar en la corriente de producto.

Los procedimientos de la invención se pueden usar para cualquier especie de molécula y se ejemplifican en el presente documento en un modo de realización preferente para la separación de una proteína de una solución que contiene la proteína. Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento son procesos robustos y escalables que se pueden aplicar genéricamente a proteínas en un amplio intervalo de tamaños y pesos moleculares (por ejemplo, polipéptidos, péptidos, inmunoglobulinas, anticuerpos, enzimas). Los procedimientos divulgados en el presente documento separan genéricamente la proteína de interés de la solución en función del tamaño. En otras palabras, los procedimientos de la invención no se basan en ningún proceso de purificación de afinidad específica o basado en afinidad o afinidad específica, y, por lo tanto, permiten el procesamiento económico y acelerado de una variedad de proteínas de una variedad de corrientes de alimentación de solución de cultivo celular. Por tanto, los procedimientos de la invención pueden dar como resultado un ahorro de los costes indirectos asociados con el procesamiento, producción y/o purificación de proteínas, por ejemplo, ahorro de costes asociados con el análisis de la corriente de alimentación o el preprocesamiento de la corriente de alimentación para asegurar la compatibilidad con los sistemas existentes.

Los procedimientos de la invención son particularmente adecuados para la separación de una proteína de interés de una corriente de alimentación que es una solución de cultivo celular. Como se usa en el presente documento, el término solución de cultivo celular y términos análogos se refieren a cualquier solución de un proceso o sistema biológico que se previsible que contenga la proteína de interés. Por lo tanto, el término solución de cultivo celular puede denotar el contenido completo del recipiente en el que se ha realizado la fermentación del cultivo celular, es decir, la producción de la proteína heteróloga o endógena. La solución de cultivo celular de acuerdo con la invención puede comprender no solo la proteína de interés, sino también otras proteínas o fragmentos de proteínas (por ejemplo, producidas de forma endógena o heteróloga por el cultivo celular o de otro modo presentes en el medio (por ejemplo, tal como se suministra)); células del cultivo celular; fragmentos de células; y/u otros constituyentes suministrados con el medio nutriente para respaldar el crecimiento celular y la producción de proteínas o constituyentes producidos por la célula huésped durante el cultivo. Por tanto, las soluciones de cultivo celular de la invención incluyen, pero no se limitan a, sobrenadantes de cultivo celular acondicionado; sobrenadantes de cultivo celular acondicionado clarificado (por ejemplo, sobrenadante de cultivo celular acondicionado que tiene partículas eliminadas por procedimientos estándar conocidos en la técnica); y cultivos celulares homogeneizados/lisados y clarificados. En todos los aspectos, se entiende que la solución de cultivo celular contiene la molécula de interés; es decir, se entiende que es una solución de cultivo celular acondicionada, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo celular acondicionado. En modos de realización preferentes de la invención, la corriente de alimentación de la TFF de dos fases es un sobrenadante de cultivo celular de una reacción de fermentación.

Como se reconoce en la técnica y como se divulga en el presente documento, la solución de cultivo celular se clarifica o esteriliza, en general, mediante filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre  $0,1 \mu\text{m}$  a  $0,45 \mu\text{m}$ , preferentemente un filtro que tiene un tamaño de poro de  $0,2 \mu\text{m}$  o  $0,22 \mu\text{m}$ , como primera fase en cualquier esquema de procesamiento. En consecuencia, en determinados modos de realización, los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento comprenden la filtración de la solución de cultivo celular por medio de un filtro adecuado para esterilización, por ejemplo, que tiene un tamaño de poro de entre  $0,1 \mu\text{m}$  y  $0,45 \mu\text{m}$ , preferentemente un tamaño de poro de  $0,2 \mu\text{m}$  o  $0,22 \mu\text{m}$ , corriente arriba de un procedimiento de TFF de dos fases divulgado en el presente documento (es decir, corriente arriba de dichas al menos dos operaciones unitarias de TFF). El uso de otros tamaños de filtros fuera de los intervalos divulgados en el presente documento, ya sea preferente o no, para la esterilización de la solución de cultivo celular como se conoce o entiende en la técnica y también lo engloba la presente invención. La presente invención no engloba el procesamiento de leche, una solución fraccionada de leche y/o un producto de leche tal como un aislado de proteína de suero. Por tanto, para todos los modos de realización divulgados en el presente documento, la corriente de alimentación y/o la corriente de producto que contiene las moléculas de interés, por ejemplo, una proteína, no es leche, una solución fraccionada de leche ni un producto de leche tal como un aislado de proteína de suero.

La presente invención proporciona un procedimiento para separar una proteína de interés de una solución de cultivo celular que contiene dicha proteína usando TFF de dos fases, en el que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF, y en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene dicha proteína de manera que dicha proteína se recupera en el retenido de la primera operación unitaria de TFF; y

(ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene dicha proteína de manera que dicha proteína se recupera en el permeado de la segunda operación unitaria de TFF.

Como se divulga en el presente documento, las operaciones unitarias de TFF de la invención comprenden el uso de membranas de ultrafiltración. Por tanto, como se define en el presente documento, se entiende que la abreviatura, "TFF", cuando se usa en el contexto de la invención, hace referencia a la ultrafiltración de flujo tangencial como esa operación unitaria se entiende comúnmente en la técnica. Los valores de corte de las membranas de las al menos dos operaciones unitarias de TFF (es decir, de la primera y la segunda operaciones unitarias de TFF) se seleccionan de manera que la molécula de interés, por ejemplo, proteína, (i) no pase a través de la membrana de la primera operación unitaria de TFF (es decir, se recupere en el retenido de la primera operación unitaria de TFF), y (ii) no pase a través de la membrana de la segunda operación unitaria de TFF (es decir, se recupere en el permeado de la segunda operación unitaria de TFF). Por lo tanto, la invención se puede caracterizar además como un procedimiento para separar una proteína de interés de una solución que contiene dicha proteína usando TFF de dos fases, en el que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF, y en el que

(i) la primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la proteína usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte tal que la proteína de interés se recupera en el retenido de la primera operación unitaria de TFF; y

(i) la segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la proteína a través de una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte tal que la proteína de interés se recupera en el permeado de la segunda operación unitaria de TFF.

Como se define en el presente documento, la membrana de ultrafiltración de la primera operación unitaria de TFF se selecciona de manera que la molécula de interés no pase a través de la membrana durante la primera operación de TFF (es decir, de manera que la proteína se recupere en el retenido de la primera operación unitaria de TFF), y la membrana de ultrafiltración de la segunda operación unitaria de TFF se selecciona de manera que la molécula de interés no pase a través de la membrana durante la segunda operación de TFF (es decir, de manera que la proteína se recupere en el permeado de la segunda operación unitaria de TFF). Normalmente, las membranas de filtración se clasifican por tamaño de poro o valores de corte, que definen el rendimiento de la membrana en función del tamaño máximo de poro de la membrana y/o el peso molecular máximo de una molécula libremente permeable en kD; por tanto, las moléculas de tamaños por encima del valor de corte del tamaño máximo de poro y/o por encima del peso molecular máximo no deben pasar a través de la membrana. Sin embargo, como se reconoce en la técnica, debido a que el rendimiento de la membrana de filtración también puede depender de factores distintos del tamaño molecular estricto, por ejemplo, la carga molecular, la presente divulgación no limita los criterios por los cuales las membranas se pueden seleccionar siempre que la molécula de interés, por ejemplo, proteína, no pasa a través de la primera membrana en la primera operación unitaria de TFF y no pasa a través de la segunda membrana de la segunda operación unitaria de TFF. Por lo tanto, los valores de corte de las membranas usadas de acuerdo con los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento se pueden seleccionar en función del rendimiento de la membrana en lugar de basarse únicamente en un valor de corte o tamaño de poro afirmado (por ejemplo, de acuerdo con las especificaciones del fabricante). Los procedimientos para determinar el rendimiento de la membrana y, específicamente, para determinar la permeabilidad de una membrana a una molécula de interés, por ejemplo, una proteína, son bien conocidos y se implementan rutinariamente en la técnica.

En relación con las operaciones unitarias de TFF de la invención, por ejemplo, la primera operación unitaria de TFF como se divulga en relación con la presente invención, las frases "no pasa a través de la membrana" y "está en el retenido de la operación unitaria de TFF" son equivalentes e indican que la membrana de la operación unitaria de TFF es esencialmente impermeable a la molécula de interés, por ejemplo, una proteína. Además, debido a que el rendimiento de la membrana puede variar en relación con las soluciones y moléculas biológicas (por ejemplo, proteínas) como se reconoce en la técnica, se entiende que las frases "no pasa a través de la membrana", "está en el retenido de la operación unitaria de TFF" y/o "esencialmente impermeable", como estos términos y frases se usan a lo largo de esta divulgación, no se deben interpretar como expresiones absolutas. Más bien, como se usa en el presente documento y de acuerdo con la comprensión en la técnica, las frases se usan con una apreciación de que la primera membrana de filtración puede presentar un "gran avance" (es decir, permitir que cantidades mínimas de la molécula de interés penetren a través de la membrana), pero que al menos un 90 % de la cantidad de la molécula de interés aplicada a la primera operación unitaria de TFF está o se puede recuperar en el retenido.

Del mismo modo, en relación con las operaciones unitarias de TFF de la invención, por ejemplo, la segunda operación unitaria de TFF como se divulga en relación con la presente invención, las frases "no pasa a través de la membrana" y "está en el permeado de la operación unitaria de TFF" son equivalentes e indican que la membrana de la operación unitaria de TFF es libremente permeable a la molécula de interés, por ejemplo, una proteína. Además, debido a que el rendimiento de la membrana puede variar en relación con las soluciones y moléculas biológicas (por ejemplo, proteínas) como se reconoce en la técnica, se entiende que las frases "no pasa a través de la membrana", "está en el permeado de la operación unitaria de TFF" y/o "esencialmente libremente permeable", como estos términos y frases se usan a lo largo de esta divulgación, no se deben interpretar como expresiones absolutas. Más bien, como se usa en el presente documento y de acuerdo con la comprensión en la técnica, las frases se usan con la apreciación de que la membrana de filtración puede no ser libremente permeable al 100 % de las moléculas de interés aplicadas al/a través del filtro y que la membrana puede presentar impermeabilidad a algún porcentaje insignificante de la carga aplicada de la molécula de interés. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, las frases indican que al menos un 90 % de la cantidad de la molécula de interés aplicada a la segunda operación unitaria de TFF está o se puede recuperar en el permeado.

En consecuencia, los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento engloban típicamente el uso de al menos dos membranas de ultrafiltración, cada una con un valor de corte, tamaño de poro y/o medición de permeabilidad diferentes. La membrana de ultrafiltración de la primera operación unitaria de TFF se selecciona de manera que la molécula de interés no pase a través de la membrana durante la operación y se pueda recuperar en el retenido de la operación. Típicamente, esto se logra seleccionando la primera membrana de ultrafiltración (es decir, la membrana de la primera operación unitaria de TFF) que tiene un valor de corte que es menor que el peso molecular de la molécula de interés. Sin embargo, como se reconoce en la técnica, el rendimiento de la membrana puede depender de otros factores más allá del tamaño molecular; por tanto, las membranas que tienen valores de corte especificados pueden, sin embargo, ser extremadamente eficientes para bloquear el paso de moléculas con un tamaño por debajo del valor de corte establecido. Por lo tanto, las membranas con valores de corte mayores que el peso molecular de la molécula de interés se pueden usar en la primera operación unitaria de TFF siempre que la molécula de interés no pase a través de la membrana durante la primera operación unitaria de TFF. Como tal, de acuerdo con la invención, la membrana particular seleccionada para uso en la primera operación unitaria de TFF no está limitada de ninguna otra manera y se puede seleccionar en función de la facilidad de fabricación o la disponibilidad comercial siempre que cumpla los otros criterios establecidos en el presente documento. En modos de realización de la invención divulgada, el valor de corte de la membrana de filtro de la primera operación unitaria de TFF puede ser 1,5, 1, 1/2, 1/3, 1/5, 1/10 o 1/15 veces el peso molecular de la molécula de interés, por ejemplo, proteína, siempre que la molécula de interés no pase a través de la membrana durante la primera operación unitaria de TFF. En otros modos de realización, el valor de corte de la membrana de filtro de la primera operación unitaria de TFF es menor de 1/15 del peso molecular de la molécula de interés. En modos de realización específicos, el valor de corte de la membrana de filtro de la primera operación unitaria de TFF como se divulga en el presente documento es 0,5 veces el peso molecular de la molécula de interés o menos. La selección de la membrana en particular también puede depender de parámetros adicionales tales como la disponibilidad (por ejemplo, si está disponible comercialmente o si está disponible por fabricación propia) o el rendimiento (por ejemplo, el rendimiento en la separación de la molécula de interés de un contaminante/impureza conocida específica).

La presente invención proporciona también que la membrana de ultrafiltración de la segunda operación unitaria de TFF se selecciona de manera que la molécula de interés no pase a través de la membrana durante la operación y se puede recuperar en el permeado de la operación unitaria. Típicamente, esto se logra seleccionando la segunda membrana de ultrafiltración (es decir, la membrana de la segunda operación unitaria de TFF) que tiene un valor de corte que es mayor que el peso molecular de la molécula de interés, pero por debajo de un máximo de 1000 kD (que es el tamaño máximo de una molécula para "ultrafiltración" como se explica en el presente documento). En consecuencia, la membrana particular seleccionada para uso en la segunda operación unitaria de TFF no está limitada de ninguna otra manera y se puede seleccionar en función de la facilidad de fabricación o la disponibilidad comercial, siempre que cumpla los criterios establecidos en el presente documento, a saber, que la molécula de interés pase a través de la membrana en la segunda operación unitaria de TFF, teniendo dicha segunda membrana un valor de corte máximo de 1000 kD. En modos de realización de la invención divulgada, el valor de corte de la membrana de filtro de la segunda operación unitaria de TFF puede ser 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 o 100 veces el peso molecular de la molécula de interés, por ejemplo, proteína, siempre que la molécula de interés no pase a través de la membrana de filtro durante la segunda operación unitaria de TFF y siempre que el valor de corte no exceda de 1000 kD.

Por lo tanto, la invención también proporciona un procedimiento para separar una proteína de interés de una solución que contiene dicha proteína usando TFF de dos fases, en el que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF, y en el que

- (i) la primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la proteína usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte tal que la proteína de interés se recupera en el retenido de la primera operación unitaria de TFF, y/o en el que el valor de corte de la primera membrana de ultrafiltración es 0,5 veces el peso molecular de la proteína; y

(ii) la segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la proteína a través de una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte tal que la proteína de interés se recupera en el permeado de la segunda operación unitaria de TFF, en el que el valor de corte de la segunda membrana de ultrafiltración no excede de 1000 kD.

La invención divulgada se refiere a procedimientos de ultrafiltración; en consecuencia, el valor de corte máximo de la membrana para su uso de acuerdo con la invención (es decir, en la segunda operación unitaria de TFF) es el límite del tamaño del límite superior para ultrafiltración como se define en la técnica, es decir, en relación con la filtración de moléculas en o por debajo de 1000 kD. En consecuencia, esto también limita el tamaño y/o el peso molecular de las moléculas de interés, por ejemplo, proteínas, englobadas por los procedimientos de la invención. Las moléculas de interés de acuerdo con la presente invención están en o por debajo del límite de tamaño superior para ultrafiltración, es decir, en o por debajo de 1000 kD. En modos de realización de la invención divulgada, el valor de corte de la membrana de filtro de la segunda operación unitaria de TFF puede ser 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 veces el peso molecular de la molécula de interés, por ejemplo, siempre que la molécula de interés no pase a través de la membrana de filtro durante la segunda operación unitaria de TFF y siempre que el valor de corte de la membrana no exceda de 1000 kD. La molécula de interés de acuerdo con la presente invención puede ser una molécula que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 kD. En determinados modos de realización de la invención, la molécula de interés es una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kD a aproximadamente 667 kD. En modos de realización preferentes, la molécula de interés es una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kD a aproximadamente 300 kD. En un modo de realización más preferente, la molécula de interés es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo y/o una proteína que tiene un peso molecular de 150 +75 kD.

En modos de realización específicos, el valor de corte de la membrana de filtro de la segunda operación unitaria de TFF como se divulga en el presente documento es al menos el doble del peso molecular de la molécula de interés, por ejemplo, proteína, pero no mayor de 1000 kD. En otras palabras, en estos modos de realización, el valor de corte de la membrana de filtro de la segunda operación unitaria de TFF como se divulga en el presente documento es 2 veces el peso molecular de la molécula de interés o mayor, y menos de 1000 kD. De acuerdo con este modo de realización, la molécula de interés tiene un peso molecular máximo de aproximadamente 500 kD.

En determinados modos de realización, la invención proporciona un procedimiento para separar una proteína de interés de una solución de cultivo celular que contiene la proteína usando TFF de dos fases, en el que la TFF de dos fases comprende al menos

(i) una primera operación unitaria de ultrafiltración de flujo tangencial que filtra una primera corriente de producto que contiene dicha proteína a través de una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte menor que el peso molecular de la proteína de interés; y

(i) una segunda operación unitaria de ultrafiltración de flujo tangencial que filtra una segunda corriente de producto que contiene dicha proteína a través de una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte mayor que el peso molecular de la proteína de interés.

Los componentes (i) y (ii) de la presente invención, en otros modos de realización se pueden caracterizar adicionalmente por que la proteína se recupera en el retenido de la primera operación unitaria de TFF y se recupera en el permeado de la segunda operación unitaria de TFF.

La invención también proporciona un procedimiento para separar una proteína de interés de una solución de cultivo celular que contiene la proteína usando TFF de dos fases en el que la TFF de dos fases comprende al menos

(i) una primera operación unitaria de ultrafiltración de flujo tangencial que filtra una primera corriente de producto que contiene dicha proteína a través de una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 0,5 veces el peso molecular de la proteína de interés o menos; y

(i) una segunda operación unitaria de ultrafiltración de flujo tangencial que filtra una segunda corriente de producto que contiene dicha proteína a través de una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de al menos dos veces el peso molecular de la proteína de interés, pero menos de 1000 kD.

Los componentes (i) y (ii) de la presente invención, en otros modos de realización se pueden caracterizar adicionalmente por que la proteína se recupera en el retenido de la primera operación unitaria de TFF y se recupera en el permeado de la segunda operación unitaria de TFF.

Como se divulga anteriormente en el presente documento, en modos de realización preferentes de la invención, la corriente de alimentación de la TFF de dos fases es un sobrenadante de cultivo celular. El sobrenadante de cultivo celular se puede esterilizar antes de la implementación de los procedimientos/operaciones de TFF de dos fases como se divulgan en el presente documento y/o de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo,



la presente invención engloba la filtración del sobrenadante de cultivo celular a través de un filtro de entre 0,1 µm y 0,45 µm corriente arriba de los procedimientos/operaciones de TFF de dos fases divulgados en el presente documento. Adicionalmente, o de forma alternativa, la presente invención engloba procedimientos y/o operaciones en los que el sobrenadante celular se filtra a través de un filtro que tiene un tamaño de poro no mayor de 0,22 µm, preferentemente un filtro de 0,2 µm o 0,22 µm de tamaño de poro, corriente arriba del resto de operaciones de TFF de dos fases como se describe en el presente documento. En consecuencia, el sobrenadante de cultivo celular se puede procesar mediante una o más operaciones adicionales antes de la implementación de los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento o se puede alimentar directamente en una de las al menos dos operaciones unitarias de TFF de la invención. Por lo tanto, en determinados modos de realización, el sobrenadante de cultivo celular (que opcionalmente se ha filtrado a través de un filtro con un tamaño de poro de entre 0,1 y 0,45 µm, preferentemente un filtro de tamaño de poro de 0,2 µm o 0,22 µm) es la primera o segunda corriente de producto filtrada por la primera o la segunda operación unitaria de TFF como se define en el presente documento, respectivamente. En consecuencia, en estos modos de realización, y con la excepción de la esterilización opcional, por ejemplo, mediante filtración como se describe en el presente documento, la primera o segunda operación unitaria de TFF como se define en el presente documento es la primera operación unitaria para procesar el sobrenadante de cultivo celular en bruto.

Por lo tanto, la invención también proporciona un procedimiento para separar una proteína de interés de una solución que contiene dicha proteína usando TFF de dos fases, en el que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF, en el que

(i) la primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la proteína usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte tal que la proteína de interés se recupera en el retenido de la primera operación unitaria de TFF, y/o en el que el valor de corte de la primera membrana de ultrafiltración es 0,5 veces el peso molecular de la proteína; y

(ii) la segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la proteína a través de una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte tal que la proteína de interés se recupera en el permeado de la segunda operación unitaria de TFF, en el que el valor de corte de la segunda membrana de ultrafiltración no excede de 1000 kD;

y en el que dicha solución es un sobrenadante de cultivo celular que se filtra a través de un filtro de tamaño de poro de entre 0,1 y 0,45 µm corriente arriba de dicha TFF de dos fases.

Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento también pueden comprender una o más fases de diafiltración. En determinados modos de realización, la diafiltración se puede combinar con la primera operación unitaria de TFF como se divulga en el presente documento (es decir, en la que el retenido de la primera operación unitaria de TFF se diafiltra, por ejemplo, para intercambio de tampón y/o para concentración de la molécula de interés como se conoce en la técnica). Como se usa a lo largo de la presente divulgación, los términos "primera" y "segunda" en relación con las al menos dos operaciones unitarias de TFF definidas en el presente documento se entienden simplemente como designadores de las operaciones unitarias de TFF individuales y no pretenden implicar ningún proceso u orden cronológico dentro del propio procedimiento de TFF de dos fases. Específicamente, la primera operación unitaria de TFF como se define en el presente documento se caracteriza por comprender una membrana de filtro de manera que la molécula de interés no pasa a través de la membrana, y la segunda operación unitaria de TFF como se define en el presente documento se caracteriza por comprender una membrana de filtro de tal manera que la molécula de interés no pasa a través de la membrana. En un modo de realización específico, la membrana de filtro usada en la primera operación unitaria de TFF como se divulga en el presente documento se caracteriza por tener un valor de corte que es aproximadamente la mitad (0,5 veces) del peso molecular de la molécula de interés o menos, y la membrana de filtro usada en la segunda operación unitaria de TFF como se divulga en el presente documento se caracteriza por tener un valor de corte que es al menos 2 veces el peso molecular de la molécula de interés pero menor de 1000 kD.

Debido a que los identificadores primera y segunda en relación con una operación unitaria de TFF no implican un proceso o un orden cronológico, los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento engloban no solo modos de realización en los que la primera operación unitaria de TFF está corriente arriba de la segunda operación unitaria de TFF, sino también modos de realización en los que la primera operación unitaria de TFF está corriente abajo de la segunda operación unitaria de TFF. Cuando la primera operación unitaria de TFF está corriente arriba de la segunda operación unitaria de TFF, la corriente de alimentación de la primera operación unitaria de TFF puede ser la corriente de permeado de la segunda operación unitaria de TFF. Cuando la corriente de alimentación de la primera operación unitaria de TFF es la corriente de permeado de la segunda operación unitaria de TFF, la primera y la segunda operaciones unitarias de TFF se pueden ejecutar en paralelo (por ejemplo, simultáneamente) para eliminar la necesidad de almacenamiento del permeado de la segunda operación unitaria de TFF.

En modos de realización preferentes, la primera operación unitaria de TFF está corriente arriba de la segunda operación unitaria de TFF. En este modo de realización, la corriente de alimentación a la TFF de dos fases puede ser

un sobrenadante de cultivo celular que se filtra opcionalmente a través de un filtro de 0,22 µm, como máximo, procesándose directamente dicha corriente de alimentación mediante la primera operación unitaria de TFF como se divulga en el presente documento (es decir, forma la primera corriente de alimentación sin un procesamiento adicional por una o más operaciones unitarias adicionales). De acuerdo con este modo de realización, la primera operación unitaria de TFF está corriente arriba de la segunda operación unitaria de TFF, y la corriente de retenido de la primera operación unitaria de TFF puede o no formar directamente la corriente de alimentación de la segunda operación unitaria de TFF (es decir, la primera operación unitaria de TFF puede ir seguida inmediatamente corriente abajo por la segunda operación unitaria de TFF, o las primera y segunda operaciones unitarias de TFF pueden estar separadas por una o más operaciones unitarias adicionales). En modos de realización preferentes, la primera operación unitaria de TFF va seguida inmediatamente corriente abajo por la segunda operación unitaria de TFF.

Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento pueden comprender una o más operaciones unitarias de TFF, pudiendo estar una o más operaciones unitarias de TFF corriente arriba de la primera operación unitaria de TFF, corriente arriba de la segunda operación unitaria de TFF, corriente arriba de la primera y segunda operaciones unitarias de TFF, corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF, corriente abajo de la segunda operación unitaria de TFF, corriente abajo de las primera y segunda operaciones unitarias de TFF, y/o intercaladas entre las primera y segunda operaciones unitarias de TFF.

La una o más operaciones unitarias de TFF adicionales del procedimiento de TFF de dos fases puede ser una tercera operación unitaria de TFF. La membrana de ultrafiltración de la tercera operación unitaria de TFF se selecciona de manera que la molécula de interés no pase a través de la membrana durante la tercera operación unitaria de TFF. Por lo tanto, los criterios para la selección de la membrana de filtro de la tercera operación unitaria de TFF son los mismos que para la selección de la membrana de filtro de la primera operación unitaria de TFF. Las membranas de filtro de la primera y tercera operación unitaria de TFF pueden ser iguales o diferentes; el valor de corte u otro parámetro de permeabilidad (por ejemplo, tamaño de poro) de las membranas de la primera y tercera operación unitaria de TFF puede ser igual o diferente.

Como se describe en el presente documento con respecto a la primera operación unitaria de TFF, el valor de corte de la membrana de la tercera operación unitaria de TFF será típicamente menor que el peso molecular de la molécula de interés. Sin embargo, según el rendimiento de la membrana, las membranas con valores de corte mayores que el peso molecular de la molécula de interés se pueden usar en la tercera operación unitaria de TFF siempre que la molécula de interés no pase a través de la membrana durante la tercera operación unitaria de TFF. En consecuencia, la membrana particular seleccionada para uso en la tercera operación unitaria de TFF no está limitada de ninguna otra manera y se puede seleccionar en función de la facilidad de fabricación o la disponibilidad comercial siempre que cumpla los otros criterios establecidos en el presente documento. En modos de realización de la invención divulgada, el valor de corte de la membrana de filtro de la tercera operación unitaria de TFF puede ser 1,5, 1, 1/2, 1/3, 1/5, 1/10 o 1/15 veces el peso molecular de la molécula de interés, por ejemplo, proteína, siempre que la molécula de interés no pase a través de la membrana durante la tercera operación unitaria de TFF. En otros modos de realización, el valor de corte de la membrana de filtro de la tercera operación unitaria de TFF es menor de 1/15 del peso molecular de la molécula de interés. Al igual que con la membrana de filtro de la primera operación unitaria de TFF, la selección de la membrana para la tercera operación unitaria de TFF también puede depender de parámetros adicionales tales como la disponibilidad (por ejemplo, si está disponible comercialmente o si está disponible por fabricación propia) o el rendimiento (por ejemplo, rendimiento en la separación de la molécula de interés de un contaminante/impureza conocido específico). En modos de realización específicos, el valor de corte de la membrana de filtro de la tercera operación unitaria de TFF como se divulga en el presente documento no es mayor de aproximadamente la mitad del peso molecular de la molécula de interés, por ejemplo, proteína. En otras palabras, en estos modos de realización, el valor de corte de la membrana de filtro de la tercera operación unitaria de TFF como se divulga en el presente documento es 0,5 veces el peso molecular de la molécula de interés o menos.

La tercera operación unitaria de TFF puede tener una membrana de ultrafiltración que es del mismo material o un material diferente que la membrana de ultrafiltración de la primera operación unitaria de TFF. En consecuencia, la membrana de ultrafiltración de la tercera operación unitaria de TFF puede tener un valor de corte que es igual o diferente que el valor de corte de la membrana de ultrafiltración de la primera operación unitaria de TFF. La tercera operación unitaria de TFF se puede combinar con diafiltración como se describe en el presente documento o de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en la técnica. En un modo de realización específico, el valor de corte de la membrana de filtro de la tercera operación unitaria es el mismo que el valor de corte de la primera operación unitaria de TFF.

En determinados modos de realización, el procedimiento de TFF de dos fases comprende una tercera operación unitaria de TFF que está corriente abajo de las primera y segunda operaciones unitarias de TFF, en el que la primera operación unitaria de TFF está corriente arriba de la segunda operación unitaria de TFF. En este modo de realización, la tercera operación unitaria de TFF puede estar directamente corriente abajo o ejecutarse en paralelo con la segunda operación unitaria de TFF, es decir, de manera que el permeado de la segunda operación unitaria de TFF (que contiene la molécula de interés) forme la corriente de producto para la tercera operación unitaria de TFF. La tercera operación unitaria de TFF también puede estar separada por una o más operaciones unitarias o procesos adicionales de la segunda operación unitaria de TFF. En determinados modos de realización, la tercera operación unitaria de TFF tiene

una membrana de filtro que tiene un valor de corte que es 0,5 veces el peso molecular de la molécula de interés o menos. En otro aspecto específico, la tercera operación unitaria de TFF tiene una membrana de filtro que tiene un valor de corte que es el mismo que el valor de corte de la membrana de filtro de la primera operación unitaria de TFF. En todos los modos de realización que comprenden la tercera operación unitaria de TFF, la corriente de alimentación del procedimiento de TFF de dos fases puede ser un sobrenadante de cultivo celular que se ha filtrado opcionalmente a través de un filtro de al menos 0,22  $\mu\text{m}$ , procesándose directamente dicha corriente de alimentación mediante la primera operación unitaria de TFF como se divulga en el presente documento (es decir, forma la primera corriente de alimentación o producto sin un procesamiento adicional por una o más operaciones unitarias adicionales). De acuerdo con este modo de realización, la primera operación unitaria de TFF está corriente arriba de la segunda operación unitaria de TFF, y la corriente de retenido de la primera operación unitaria de TFF puede o no formar directamente la corriente de producto/alimentación de la segunda operación unitaria de TFF (es decir, la primera operación unitaria de TFF puede ir seguida inmediatamente corriente abajo por la segunda operación unitaria de TFF, o una o más operaciones unitarias adicionales pueden separar las primera y segunda operaciones unitarias de TFF).

En determinados modos de realización, la molécula de interés es una biomolécula que es una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 kD, aproximadamente 25 a aproximadamente 300 kD, aproximadamente 50 a aproximadamente 300 kD, aproximadamente 75 a aproximadamente 300 kD, aproximadamente 100 a aproximadamente 300 kD, aproximadamente 120 a aproximadamente 300 kD, aproximadamente 135 a aproximadamente 300 kD, aproximadamente 10 a aproximadamente 200 kD, aproximadamente 25 a aproximadamente 200 kD, aproximadamente 50 a aproximadamente 200 kD, aproximadamente 75 a aproximadamente 200 kD, aproximadamente 100 a aproximadamente 200 kD, aproximadamente 120 a aproximadamente 200 kD, aproximadamente 135 a aproximadamente 200 kD, aproximadamente 10 a aproximadamente 175 kD, aproximadamente 25 a aproximadamente 175 kD, aproximadamente 50 a aproximadamente 175 kD, aproximadamente 75 a aproximadamente 175 kD, aproximadamente 120 a aproximadamente 175 kD o aproximadamente 135 a aproximadamente 175 kD.

En modos de realización preferentes, la molécula de interés es una biomolécula que es una proteína que tiene un peso molecular de 150 +75 kD. En consecuencia, en modos de realización, la proteína de interés puede ser aproximadamente 75 kD, aproximadamente 80 kD, aproximadamente 90 kD, aproximadamente 95 kD, aproximadamente 100 kD, aproximadamente 105 kD, aproximadamente 110 kD, aproximadamente 115 kD, aproximadamente 120 kD, aproximadamente 125 kD, aproximadamente 130 kD, aproximadamente 135 kD, aproximadamente 140 kD, aproximadamente 150 kD, aproximadamente 155 kD, aproximadamente 160 kD, aproximadamente 165 kD, aproximadamente 170 kD, aproximadamente 175 kD, aproximadamente 180 kD, aproximadamente 185 kD, aproximadamente 190 kD, aproximadamente 195 kD, aproximadamente 200 kD, aproximadamente 205 kD, aproximadamente 210 kD, aproximadamente 215 kD, aproximadamente 220 kD o aproximadamente 215 kD. De forma alternativa o adicionalmente, la proteína de interés se puede caracterizar por tener un peso molecular que es  $150 \pm 15$  kD,  $150 \pm 30$  kD,  $150 \pm 50$  kD. Los ejemplos de proteínas que tienen un peso molecular de  $150 \pm 75$  kD incluyen inmunoglobulinas y anticuerpos. Los ejemplos de procedimientos de TFF de dos fases que se pueden usar con proteínas que tienen un peso molecular de  $150 \pm 75$  kD (por ejemplo,  $150 \pm 30$  y/o  $150 \pm 15$  kD) comprenden, para la primera operación unitaria de TFF, una membrana de filtro que tiene un valor de corte de 50 kD o menos; para la segunda operación unitaria de TFF, una membrana de filtro que tiene un valor de corte de al menos 300 kD pero no mayor de 1000 kD; y una tercera operación unitaria de TFF opcional que tiene un valor de corte de 50 kD o menos. Un ejemplo específico de un procedimiento de TFF de dos fases para dichas proteínas comprende el uso de, para la primera operación unitaria de TFF, una membrana de filtro que tiene un valor de corte de 30 kD a 50 kD (preferentemente 50 kD); para la segunda operación unitaria de TFF, una membrana de filtro que tiene un valor de corte de 300 kD; y una tercera operación unitaria de TFF opcional que tiene una membrana de filtro con un valor de corte de 30 kD a 50 kD (preferentemente 50 kD).

Como se divulga en el presente documento, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular (por ejemplo, un sobrenadante de un cultivo de células de hibridoma que expresan el anticuerpo de interés) usando TFF de dos fases, en el que el TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF, y una de la tercera operación unitaria de TFF opcional, y en el que

- (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 30 kD a 50 kD (preferentemente 50 kD);
- (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de al menos 300 kD pero no más de 1000 kD (preferentemente 300 kD); y
- (iii) dicha tercera operación unitaria de TFF opcional filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 30 kD a 50 kD o menos (preferentemente 50 kD).

En un aspecto preferente asociado con el modo de realización descrito en este párrafo, la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que opcionalmente se ha esterilizado. La esterilización opcional se puede efectuar por cualquier procedimiento conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento. Por ejemplo, la esterilización de la primera corriente de producto corriente arriba de la primera operación unitaria de TFF se puede efectuar por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1 µm y 0,45 µm, y se realiza preferentemente por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,2 µm o 0,22 µm. En otro aspecto preferente asociado con el modo de realización descrito en este párrafo, la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF; es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF. En otro aspecto preferente asociado con el modo de realización descrito en este párrafo, la tercera operación unitaria de TFF opcional está, si está presente, directamente corriente abajo o se ejecuta en paralelo con la segunda operación unitaria de TFF; es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las segunda y tercera (cuando esté presente) operaciones unitarias de TFF.

Los aspectos y/o modos de realización preferentes resumidos a lo largo de la divulgación se divulgan expresamente como aspectos separados, que se pueden implementar individualmente en el procedimiento de TFF de dos fases, y también se divulgan como aspectos combinatorios que se pueden combinar con uno o más de otros aspectos preferentes. Por tanto, por ejemplo, la invención engloba un procedimiento para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular (por ejemplo, un sobrenadante de un cultivo de células de hibridoma que expresan el anticuerpo de interés) usando TFF de dos fases, en el que el TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF, y una de la tercera operación unitaria de TFF opcional, y en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD;

(ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 300 kD; y

(iii) dicha tercera operación unitaria de TFF opcional filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD.

en el que dicha primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que opcionalmente se ha esterilizado por filtración a través de una membrana de filtro que tiene un tamaño de poro no mayor de 0,22 µm; en el que dicha segunda operación unitaria de TFF está inmediatamente corriente abajo de dicha primera operación unitaria de TFF; y en el que dicha tercera operación unitaria de TFF opcional está, si está presente, inmediatamente corriente abajo o se ejecuta en paralelo con dicha segunda operación unitaria de TFF.

En un modo de realización específico del procedimiento de dos fases de TFF descrito inmediatamente con anterioridad, la primera corriente de producto es el sobrenadante de cultivo celular que solo se ha filtrado opcionalmente con un filtro de 0,22 µm, y la primera operación unitaria de TFF está inmediatamente corriente arriba de la segunda operación unitaria de TFF, siendo la segunda operación unitaria de TFF inmediatamente corriente arriba de la tercera operación unitaria de TFF opcional (es decir, este modo de realización específico del procedimiento de TFF de dos fases no comprende el uso de otras operaciones unitarias entre las primera, segunda y tercera opcional operaciones unitarias de TFF). Además, la tercera operación unitaria de TFF opcional se puede ejecutar en paralelo con la segunda operación unitaria de TFF o se puede implementar después de completar la segunda operación unitaria de TFF (es decir, cada operación unitaria TFF se ejecuta de forma discontinua). En otros modos de realización relacionados, el procedimiento de TFF de dos fases comprende el uso de una o más operaciones unitarias adicionales que se intercalan entre las primera y segunda, y/o entre la segunda y tercera opcional operaciones unitarias de TFF.

Como se usa en el presente documento, las frases "se hace funcionar inmediatamente corriente arriba", "se hace funcionar directamente corriente abajo", "está inmediatamente corriente arriba", "está inmediatamente corriente abajo" y frases análogas no implican un componente cronológico; por tanto, por ejemplo, la primera y segunda operación unitaria de TFF o la segunda y tercera operación unitaria de TFF no necesitan ocurrir o proceder ambas dentro de un período de tiempo específico. Más bien, las frases indican que la corriente de producto no se procesa por ninguna otra operación unitaria entre la primera y segunda o entre la segunda y tercera operaciones unitarias; por tanto, por ejemplo, la primera operación unitaria de TFF se puede ejecutar en, por ejemplo, modo discontinuo, la corriente de producto, es decir, la corriente de retenido, almacenada y/o transportada y almacenada, y luego, en algún momento futuro, la corriente de producto se procesa por la segunda operación unitaria de TFF (siempre que no haya habido ninguna operación unitaria intermedia).

En determinados aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF y en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

5 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD.

10 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

15 en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

20 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD;

25 y en el que

la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF; es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF.

30 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

35 en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

40 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD.

45 y en el que

la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ ).

50 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

55 en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

60 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD.

65 y en el que

dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera y dicha segunda operaciones unitarias de TFF.

5 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

10 en el que

15 (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

(ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD;

20 en el que

la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ );

25 y en el que

la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF).

30 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

35 en el que

40 (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

45 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD;

en el que

50 la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ );

y en el que

55 dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera y dicha segunda operaciones unitarias de TFF.

60 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

5 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD;

en el que

10 la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

15 y en el que

dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera y dicha segunda operaciones unitarias de TFF.

20 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

25 en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

(ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD;

35 en el que

la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ );

40 en el que

la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

45 y en el que

50 dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera y dicha segunda operaciones unitarias de TFF.

55 En determinados aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

en el que

60 (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

65 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

(iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD.

En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

(ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

(iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

en el que

la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

y en el que

la tercera operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo o en paralelo con la segunda operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las segunda y la tercera operaciones unitarias de TFF).

En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

(ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

(iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

y en el que

la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ ).

En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

en el que



(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

5 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

10 (iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

y en el que

15 dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera, dicha segunda y dicha tercera operaciones unitarias de TFF.

20 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

25 en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

30 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

35 (iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

en el que

40 la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

45 en el que

la tercera operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo o en paralelo con la segunda operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las segunda y la tercera operaciones unitarias de TFF);

50 y en el que

la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ ).

55 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

60 en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

65

(ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

5 (iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

en el que

10 la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

15 en el que

la tercera operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo o en paralelo con la segunda operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las segunda y la tercera operaciones unitarias de TFF);

20 y en el que

dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera, dicha segunda y dicha tercera operaciones unitarias de TFF.

25 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

30 en el que

35 (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

40 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

45 (iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

en el que

50 la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ );

y en el que

55 dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera, dicha segunda y dicha tercera operaciones unitarias de TFF.

60 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

en el que

65 (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

(ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

(iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

en el que

la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

en el que

la tercera operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo o en paralelo con la segunda operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las segunda y la tercera operaciones unitarias de TFF);

en el que

la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ );

y en el que

dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera, dicha segunda y dicha tercera operaciones unitarias de TFF.

Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento son eficaces para reducir los niveles de contaminantes e impurezas de la solución que contiene la molécula de interés. En particular, los procedimientos de TFF de dos fases de la invención son eficaces para reducir los niveles de contaminantes y/o impurezas en una corriente de alimentación en bruto de una solución de cultivo celular (por ejemplo, un sobrenadante de cultivo celular opcionalmente filtrado a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ ) antes del procesamiento corriente abajo en una o más operaciones unitarias (por ejemplo, columnas cromatográficas). Como se usa en el presente documento, los términos "contaminante", "impureza" y términos análogos tienen su significado estándar conocido en la técnica y, en particular, indican componentes no deseados en la solución que contiene la molécula de interés. Los ejemplos de dichos componentes no deseados que se pueden encontrar en la corriente de alimentación en bruto de una solución de cultivo celular (por ejemplo, sobrenadante de cultivo celular opcionalmente filtrado a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ ) incluyen proteínas no deseadas, moléculas pequeñas no deseadas, fragmentos de la molécula de interés, agregados de la molécula de interés, componentes no deseados del medio de cultivo celular, componente no deseado producido por la célula (ya sea endógeno o heterólogo). En general, dichos contaminantes y/o impurezas se mencionan en la bibliografía como proteínas de célula huésped ("HCP") y ADN de célula huésped ("HCDNA").

En ejemplos, la solución de cultivo celular (por ejemplo, sobrenadante de cultivo celular) que forma la corriente de alimentación de la TFF de dos fases de la presente invención puede tener una concentración de HCDNA de al menos 500 000 pg/mg de proteína de interés, al menos 750 000 pg/mg de proteína de interés, o al menos 1 000 000 pg/mg de proteína de interés antes de la operación de los procedimientos de TFF de dos fases como se divulga en el presente documento. De forma alternativa o adicionalmente, la solución de cultivo celular (por ejemplo, sobrenadante de cultivo celular) que forma la corriente de alimentación de la TFF de dos fases de la presente invención puede tener una concentración de HCP de al menos 100 000 ng/mg de proteína de interés, al menos 150 000 ng/mg de proteína de interés, o al menos 200 000 ng/mg de proteína de interés antes de la operación de los procedimientos de TFF de dos fases como se divulga en el presente documento.

Los procedimientos de TFF de dos fases de la presente invención pueden reducir el nivel de HCP en la solución de cultivo celular que contiene la proteína de interés (por ejemplo, sobrenadante de cultivo celular) en al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 % o al menos un 50 %. De forma alternativa o adicionalmente, los procedimientos de TFF de dos fases de la presente invención pueden reducir el nivel de HCDNA en la solución de cultivo celular que contiene la proteína de interés (por ejemplo, sobrenadante de cultivo celular) en al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %. En determinados modos de realización, el procedimiento de TFF de dos fases divulgado en el presente documento reduce el nivel de HCDNA en la solución que contiene la proteína de interés en un 85 a 95 %. El

porcentaje de reducción se puede determinar de acuerdo con cualquier procedimiento divulgado en el presente documento y/o conocido en la técnica adecuado para la determinación de la concentración de HCP y/o HCDNA, y se calcula comparando el nivel de HCP y/o HCDNA en la solución que contiene la proteína de interés posterior a la implementación de TFF de dos fases con ese nivel en la solución que contiene la proteína de interés antes de la implementación de TFF de dos fases (por ejemplo, en la corriente de alimentación en bruto). Debido a que la TFF de dos fases puede comprender una o más etapas de diafiltración y/o intercambio de tampón como se divulga en el presente documento, la composición de la solución que contiene la proteína de interés con respecto a componentes distintos de HCP y HCDNA también puede cambiar significativamente durante el procedimiento.

En un modo de realización específico, en el que la solución que contiene la proteína de interés antes de la implementación del procedimiento de TFF de dos fases es un sobrenadante de cultivo celular, el procedimiento de TFF de dos fases reduce la concentración de HCDNA en la solución a 600 000 pg por mg de dicha proteína o menos, a 500 000 pg por mg de dicha proteína o menos, a 400 000 pg por mg de dicha proteína o menos, a 300 000 pg por mg de dicha proteína o menos o a 200 000 pg por mg de dicha proteína o menos, y/o reduce la concentración de HCP en la solución a 450 000 ng por mg de dicha proteína o menos, a 400 000 ng por mg de dicha proteína o menos o a 350 000 ng por mg de dicha proteína o menos.

Los procedimientos de la invención son, en determinados modos de realización, adecuados para la purificación de una proteína de interés a partir de una reacción de fermentación en el que la reacción de fermentación produce una alta concentración de proteína. Por tanto, en determinados modos de realización, los procedimientos de la invención engloban la purificación de una proteína de interés de una solución de cultivo celular en la que la proteína tiene una concentración de al menos 200 mg/l, 400 mg/l, 600 mg/l, 700 mg/l, 800 mg/l, 900 mg/l, 1 g/l, 1,5 g/l, 2 g/l, 2,5 g/l, 3 g/l, 3,5 g/l, 4 g/l, 4,5 g/l o 5 g/l en la solución.

En determinados aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

(ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD;

y en el que, después de la operación de la primera y segunda operaciones unitarias de TFF,

(a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

(b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

(c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

(d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos.

En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

(ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD;

1.

5 en el que

la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

10

y en el que, después de la operación de la primera y segunda operaciones unitarias de TFF,

(a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

15

(b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

20

(c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

25

(d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos.

25 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

30 en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

35

(ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD.

40 en el que

la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ );

45 y en el que, después de la operación de la primera y segunda operaciones unitarias de TFF,

(a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

50

(b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

55

(c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

60

(d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos.

60 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

65 en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

5 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD.

10 en el que, después de la operación de la primera y segunda operaciones unitarias de TFF,

(a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

15 (b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

(c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

20 (d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos;

y en el que

25 dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera y dicha segunda operaciones unitarias de TFF.

30 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

35 en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

40 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD;

45 en el que

la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ );

50 en el que

la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

55 y en el que, después de la operación de la primera y segunda operaciones unitarias de TFF,

(a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

60 (b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

(c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

65

(d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos.

5 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

en el que

10 (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

15 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD;

en el que

20 la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1 µm y 0,45 µm (preferentemente 0,2 µm o 0,22 µm);

en el que, después de la operación de la primera y segunda operaciones unitarias de TFF,

25 (a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

30 (b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

(c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

35 (d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos;

y en el que

40 dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera y dicha segunda operaciones unitarias de TFF.

45 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

en el que

50 (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

55 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD;

en el que

60 la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

65 en el que, después de la operación de la primera y segunda operaciones unitarias de TFF,

(a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

5 (b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

(c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

10 (d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos;

y en el que

15 dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera y dicha segunda operaciones unitarias de TFF.

20 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF,

en el que

25 (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD; y

30 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD;

en el que

35 la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ );

en el que

40 la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

45 en el que, después de la operación de la primera y segunda operaciones unitarias de TFF,

(a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

50 (b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

(c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

55 (d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos;

y en el que

60 dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera y dicha segunda operaciones unitarias de TFF.

65 En determinados aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos



fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF, y en el que

5 (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

10 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

15 (iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

y en el que, después de la operación de la primera, segunda y tercera operaciones unitarias de TFF,

20 (a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

(b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

25 (c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

(d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos.

30 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

35 en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

40 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

45 (iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

50 en el que

la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

55 en el que

la tercera operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo o en paralelo con la segunda operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las segunda y la tercera operaciones unitarias de TFF);

60 y en el que, después de la operación de la primera, segunda y tercera operaciones unitarias de TFF,

(a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

65

(b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

5 (c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

(d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos.

10 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF, en el que

15 (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

20 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

25 (iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

en el que

30 la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ );

y en el que, después de la operación de la primera, segunda y tercera operaciones unitarias de TFF,

35 (a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

(b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

40 (c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

45 (d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos.

50 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

en el que

55 (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

60 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

(iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

65 en el que, después de la operación de la primera, segunda y tercera operaciones unitarias de TFF,

(a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

5 (b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

(c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

10 (d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos;

y en el que

15 dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera, dicha segunda y dicha tercera operaciones unitarias de TFF.

20 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

en el que

25 (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

30 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

35 (iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

en el que

40 la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

en el que

45 la tercera operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo o en paralelo con la segunda operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las segunda y la tercera operaciones unitarias de TFF);

50 en el que

la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ );

55 y en el que, después de la operación de la primera, segunda y tercera operaciones unitarias de TFF,

(a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

60 (b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

(c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

65

(d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos.

5 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

10 en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

15 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

20 (iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

en el que

25 la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

en el que

30 la tercera operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo o en paralelo con la segunda operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las segunda y la tercera operaciones unitarias de TFF);

35 en el que, después de la operación de la primera, segunda y tercera operaciones unitarias de TFF,

(a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

40 (b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

45 (c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

(d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos;

y en el que

50 dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera, dicha segunda y dicha tercera operaciones unitarias de TFF.

55 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

60 en el que

(i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

65

(ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

5 (iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

en el que

10 la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ );

en el que, después de la operación de la primera, segunda y tercera operaciones unitarias de TFF,

15 (a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

20 (b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

(c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

25 (d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos.

y en el que

30 dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera, dicha segunda y dicha tercera operaciones unitarias de TFF.

35 En otros aspectos, la invención engloba procedimientos para separar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) de interés de un sobrenadante de cultivo celular que comprende la inmunoglobulina usando TFF de dos fases, en los que la TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF y una tercera operación unitaria de TFF,

en el que

40 (i) dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

45 (ii) dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD, preferentemente 300 kD; y

50 (iii) dicha tercera operación unitaria de TFF filtra una tercera corriente de producto que contiene la inmunoglobulina de interés usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD o menos, preferentemente 50 kD;

en el que

55 la segunda operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las primera y la segunda operaciones unitarias de TFF);

en el que

60 la tercera operación unitaria de TFF se hace funcionar directamente corriente abajo o en paralelo con la segunda operación unitaria de TFF (es decir, en este aspecto, no hay operaciones unitarias intermedias entre las segunda y la tercera operaciones unitarias de TFF);

65 en el que

la primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular que se ha esterilizado por filtración a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  (preferentemente 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ );

en el que, después de la operación de la primera, segunda y tercera operaciones unitarias de TFF,

(a) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 10 % con respecto a la concentración de HCP en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

(b) la concentración de HCP en la solución que contiene la inmunoglobulina es 400 000 ng por mg de la inmunoglobulina o menos; y/o

(c) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina se reduce en al menos un 30 % con respecto a la concentración de HCDNA en el sobrenadante de cultivo celular; y/o

(d) la concentración de HCDNA en la solución que contiene la inmunoglobulina es 1 500 000 pg por mg de inmunoglobulina o menos;

y en el que

dichos procedimientos comprenden además un proceso de cromatografía (por ejemplo, un proceso de cromatografía de intercambio iónico y/o un proceso de cromatografía de afinidad) corriente abajo de dicha primera, dicha segunda y dicha tercera operaciones unitarias de TFF.

Cualquiera de los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento, ya sea descrito como un aspecto y/o un modo de realización de la invención, y ya sea descrito como preferente o no, se puede combinar con procesos de purificación estándar corriente abajo conocidos en la técnica, tales como purificación por afinidad o, en particular, con procesos de purificación corriente abajo que no se basan en aislamiento por afinidad, por ejemplo, procesos de cromatografía de intercambio iónico. En un ejemplo específico, cualquiera de los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento puede estar corriente arriba de un proceso de purificación por afinidad que comprende, por ejemplo, el uso de Proteína A (por ejemplo, cromatografía con Proteína A). En otros ejemplos, cualquiera de los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento puede estar corriente arriba de los procesos de purificación sin afinidad que comprenden, por ejemplo, procesos/operaciones unitarias de cromatografía como CEX y/o AEX. En modos de realización particulares, los procedimientos de TFF de dos fases pueden estar corriente arriba de los procesos de purificación sin afinidad que comprenden tanto CEX como AEX, en los que la AEX está opcionalmente corriente arriba de la CEX.

En determinados modos de realización, los procedimientos de TFF de dos fases están corriente arriba de un proceso/operación unitaria de CEX en los que el pH de la solución que contiene la molécula de interés se ajusta a 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 o 7,0 antes del proceso/operación unitaria de CEX. En un aspecto particular de este modo de realización, el ajuste del pH antes de CEX de acuerdo con los procedimientos de la invención no está asociado con la precipitación de HCP y/o HCDNA dentro de la solución. En determinados aspectos de acuerdo con este modo de realización, los procedimientos de TFF de dos fases están corriente arriba de un proceso/operación unitaria de CEX, en los que un proceso de precipitación o filtración de precipitados no se implementa antes del proceso/operación unitaria de CEX.

Otros objetos y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción en la que se exponen, a modo de ilustración y ejemplo, determinados modos de realización de la presente invención.

## DEFINICIONES

En general, las siguientes palabras o frases tienen la definición indicada cuando se usan en el sumario, la descripción, los ejemplos y las reivindicaciones.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" en relación con un número indica  $\pm 5\%$  del número. Cuando se usa en relación con una medición realizada por un dispositivo (por ejemplo, pH determinado por un peachímetro) o realizada de acuerdo con un procedimiento estándar conocido en la técnica (por ejemplo, concentración de proteína de una solución determinada por HPLC, adsorción de UV, ELISA, kits estándar (por ejemplo, ensayo colorimétrico), indica un número dentro del error estándar conocido para dicho dispositivo o dentro de una desviación estándar del valor determinado para dicho procedimiento.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales únicos (incluidos anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes; así como anticuerpos desinmunizados, murinos, quiméricos, humanizados y humanos), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, triacuerpos, inmunoconjugados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos camelizados, Fvs monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentoF(ab')<sub>2</sub>, Fvs unidos por enlaces disulfuro (sdFv), intracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de

cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. El término "anticuerpo" también engloba moléculas de inmunoglobulina de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>) o subclase.

Como se usa en el presente documento, el término "entre" en relación con la definición de un intervalo incluye expresamente los puntos finales de ese intervalo. Por tanto, si el parámetro se define en el presente documento como "entre X e Y", se pretende expresamente que el parámetro pueda tener un valor igual a X o mayor que X, siempre que el valor sea como máximo Y, es decir, no sea mayor de Y. En otras palabras, los valores definidos por la frase "entre X e Y" y construcciones análogas incluyen expresamente los valores X e Y. Por ejemplo, como se usa a lo largo de esta divulgación, se pretende expresamente que la frase "en la que la membrana tiene un valor de corte de entre 300 kD y 100 kD" englobe modos de realización en los que la membrana tiene un valor de corte de 300 kD, así como modos de realización en los que la membrana tiene un valor de corte de 1000 kD.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente, y todas estas designaciones incluyen la descendencia. En particular, la invención engloba la separación y/o purificación de moléculas de interés, por ejemplo, proteínas, a partir de productos de células, líneas celulares y cultivos celulares. Dichos productos incluyen típicamente medios celulares acondicionados y/o células y cultivos celulares lisados y homogeneizados (por ejemplo, células y componentes celulares homogeneizados dentro de medios celulares acondicionados). Los procedimientos de la invención son particularmente adecuados para el procesamiento de productos de células, líneas celulares y cultivos celulares transgénicos, en los que las células, líneas celulares y cultivos celulares transgénicos expresan la molécula de interés. En modos de realización preferentes, la invención engloba el uso de medios de cultivo celular acondicionados y clarificados.

Se entiende que los procedimientos de la invención se refieren a la separación, purificación y/o procesamiento de una molécula de interés, por ejemplo, una proteína, de una solución que contiene la molécula. Como tal, cuando la solución que contiene la molécula de interés es un medio de cultivo celular o una parte fraccionada o clarificada de medio de cultivo celular, se entiende que dicho medio es necesariamente un medio de cultivo celular acondicionado (para que comprenda la molécula de interés). Por lo tanto, como se usa en el presente documento, el término "solución de cultivo celular" y términos análogos se refieren a cualquier solución de un proceso o sistema biológico que se prevé que contenga la molécula de interés, incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, sobrenadante de cultivo celular acondicionado; sobrenadante de cultivo celular acondicionado clarificado; cultivos celulares homogeneizados/lisados clarificados, etc. En modos de realización preferentes de la invención, la corriente de alimentación de la TFF de dos fases es un sobrenadante de cultivo celular como se define en el presente documento.

Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento también engloban el procesamiento opcional de un medio de cultivo celular para clarificación y/o esterilización corriente arriba de la primera operación unitaria de TFF, es decir, antes de la operación de las operaciones unitarias de TFF de dos fases descritas en esta divulgación. Como se usa en el presente documento, el término "clarificado" y "clarificación" se refieren a la eliminación de partículas de una solución, incluida la esterilización por filtración. El término "esterilizado" como se usa en el presente documento se entiende que se va a usar en relación con una solución que contiene proteínas; en consecuencia, se entiende que la "esterilización" de dichas soluciones se efectúa preferentemente por filtración y no por calor para evitar la desnaturalización de proteínas y/o la agregación de proteínas. Una solución "clarificada"/"esterilizada" con referencia a cualquier medio de cultivo celular englobado por los procedimientos de la invención es una solución que se ha filtrado a través de una membrana de entre 0,1 µm y 0,45 µm, preferentemente un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,2 µm o 0,22 µm.

Como se usa en el presente documento, el término "ultrafiltración de flujo tangencial de dos fases", "TFF de dos fases" y términos análogos se refieren al uso de al menos dos operaciones unitarias de TFF y/o diafiltración/TFF en combinación. En determinados modos de realización, el término "TFF de dos fases" se refiere al uso de tres o más operaciones unitarias de TFF y/o diafiltración/TFF en combinación. El uso del término "en combinación" no restringe el orden en que la solución que contiene la molécula de interés (por ejemplo, proteína) procede a través de las dos o más operaciones unitarias de TFF y/o diafiltración/TFF. El término "en combinación" tampoco restringe el procedimiento del proceso al uso de al menos dos operaciones unitarias de TFF y/o diafiltración/TFF en secuencia inmediata (es decir, una operación unitaria inmediatamente después de la otra); por lo tanto, la filtración de flujo tangencial de dos fases engloba procesos que comprenden una o más operaciones unitarias que no son TFF y/o diafiltración/TFF intercaladas entre las al menos dos operaciones unitarias de TFF y/o diafiltración/TFF definidas explícitamente por los procedimientos descritos en el presente documento. El uso del término "en combinación" tampoco restringe el momento de las dos o más operaciones unitarias de TFF y/o diafiltración/TFF individuales descritas en el presente documento, y las dos o más operaciones unitarias individuales pueden estar separadas por 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas o 72 horas. Además, las dos o más operaciones unitarias individuales pueden proceder concomitantemente entre sí, por ejemplo, ejecutarse en paralelo como se conoce en la técnica. El término "TFF de dos fases" también se puede referir al uso de al menos dos operaciones unitarias de TFF y/o diafiltración/TFF en combinación con los protocolos o procesos de purificación estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, CEX y AEX.

Como se usa en el contexto de los procedimientos divulgados en el presente documento, la expresión "corriente de alimentación en bruto" se refiere típicamente a la materia prima o solución en bruto derivada de un esquema de producción que se entrega a la operación unitaria inicial, conteniendo dicha materia prima la molécula de interés (por ejemplo, biomolécula, proteína, polipéptido, anticuerpo, etc.) y pudiendo contener además diversos contaminantes (por ejemplo, proteínas no deseadas, fragmentos de células, virus, ADN, etc.). En cambio, la "corriente de producto" se usa típicamente en un contexto más general para referirse a una solución que contiene la molécula de interés que puede o no haber sido ya objeto de cierto procesamiento (por ejemplo, una o más operaciones unitarias, incluyendo clarificación, filtración, etc.). Sin embargo, para los fines de los procedimientos de la invención, cualquier distinción entre "corriente de alimentación" y "corriente de producto" es irrelevante, ya que ambos términos se refieren simplemente a soluciones que contienen el producto de interés (por ejemplo, biomolécula, proteína, polipéptido, anticuerpo, etc.), pudiendo procesarse, en general, dichas soluciones de acuerdo con los procedimientos de la invención independientemente de si se ha producido un procesamiento corriente arriba anterior. Si es necesaria alguna distinción entre "corriente de alimentación" y "corriente de producto" para los fines de esta divulgación, será fácilmente evidente para un experto en la técnica a partir del contexto.

Como se usa en el presente documento, los términos "microfiltración" y "ultrafiltración" se refieren a parámetros de filtración como se entiende comúnmente en la técnica. En particular, el término microfiltración se refiere comúnmente al uso de una membrana de filtración con un tamaño de poro entre 0,1 y 10  $\mu\text{m}$ , y el término ultrafiltración se refiere al uso de una membrana de filtración con un tamaño de poro de entre 0,001 y 0,1  $\mu\text{m}$ . La microfiltración se usa típicamente para clarificación, esterilización, eliminación de micropartículas y para la recolección de células; la ultrafiltración se usa típicamente para separar y concentrar moléculas disueltas (por ejemplo, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y otras biomoléculas), para tampones de intercambio y para fraccionamiento grosero. Los procedimientos de la presente invención se refieren a ultrafiltración usando operaciones unitarias de TFF y diafiltración/TFF. En determinados modos de realización, los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento también pueden comprender el uso de membranas de ultrafiltración o membranas con tamaños de poros incluso mayores en, por ejemplo, una o más unidades de diafiltración, para operaciones unitarias tales como esterilización antes, es decir, corriente arriba, de la operación unitaria inicial/primera de TFF descrita en el presente documento. La esterilización de fluidos de carga, por ejemplo, sobrenadantes de cultivos celulares que contienen proteínas de interés, por medio de procedimientos de filtración, es bien conocida en la técnica y típicamente comprende la filtración del sobrenadante a través de membranas de filtro que tienen tamaños de poros que varían de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 0,45  $\mu\text{m}$ . En consecuencia, la presente invención también engloba procedimientos de TFF de dos fases que comprenden la esterilización de un sobrenadante de cultivo celular antes de la operación unitaria inicial/primera de TFF, en los que la esterilización se efectúa por filtración a través de una membrana de filtro adecuada que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$ , preferentemente un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,2 o 0,22  $\mu\text{m}$ .

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de interés" y expresiones análogas se refieren a una molécula que se va a separar de una solución o suspensión. Las moléculas de interés se separan de otras partículas o moléculas en la solución o suspensión en función del tamaño de la molécula de interés. En algunos modos de realización de los procedimientos divulgados en el presente documento, las moléculas de interés también se separan del componente de fluido original de la solución o suspensión mediante un proceso de intercambio de tampón por medio de, por ejemplo, una operación unitaria de diafiltración. La separación de las moléculas de interés de los contaminantes y/u otros componentes no deseados de la solución o suspensión también se puede denominar "purificación". En modos de realización preferentes, las moléculas de interés son biomoléculas. Es decir, las moléculas de interés son de origen biológico o bioquímico y/o son producidas por cultivos de células de mamíferos o microorganismos (por ejemplo, bacterias, hongos levaduriformes), pudiendo ser dichos cultivos celulares transgénicos o no. Por lo tanto, la molécula de interés, por ejemplo, proteína, puede ser una molécula producida de forma natural por un cultivo celular o puede ser un producto recombinante. Las moléculas de interés también se pueden producir *in vivo* usando modelos animales, por ejemplo, animales transgénicos, o se pueden producir mediante procesos *in vitro*. Los procesos *in vitro* se pueden basar en las rutas bioquímicas encontradas en células de mamíferos y/o microorganismos. Los ejemplos de moléculas de interés en el contexto de los presentes procedimientos incluyen proteínas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, enzimas y fragmentos de los mismos.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**La figura 1** es un esquema de un proceso de TFF de dos fases para la separación de una proteína que tiene un peso molecular de  $150 \pm 30$  kD (por ejemplo, un anticuerpo) que tiene una operación unitaria de TFF/concentración que comprende una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD, seguida de una operación unitaria de TFF/diafiltración que tiene una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 300 kD.

**La figura 2** es un esquema de un proceso de TFF de dos fases para la separación de una proteína que tiene un peso molecular de  $150 \pm 30$  kD (por ejemplo, un anticuerpo) que tiene una operación unitaria de TFF/diafiltración que comprende una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD, seguida de una operación unitaria de TFF/diafiltración que tiene una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 300 kD.



La **figura 3** es un esquema de un proceso de TFF de dos fases para la separación de una proteína que tiene un peso molecular de  $150 \pm 30$  kD (por ejemplo, un anticuerpo) que tiene una operación unitaria de TFF/concentración/diafiltración que comprende una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD, seguida de una operación unitaria de TFF/diafiltración que comprende una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 300 kD, que va seguida de una tercera operación unitaria de TFF/concentración que tiene una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD.

La **figura 4** es un esquema de un proceso de TFF de dos fases para la separación de una proteína que tiene un peso molecular de  $150 \pm 30$  kD (por ejemplo, un anticuerpo) que tiene una operación unitaria de TFF/concentración/diafiltración que comprende una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD, seguida de una operación unitaria de TFF/diafiltración que comprende una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 300 kD que está conectada en paralelo a una tercera operación unitaria de TFF/concentración que tiene una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

Sorprendentemente, se ha descubierto que el uso de la ultrafiltración de flujo tangencial de dos fases ("TFF de dos fases") para separar una molécula de interés de una solución que contiene la molécula reduce drásticamente el nivel de contaminantes en la solución en relación con los procesos de purificación estándar. Como tales, los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento pueden complementar esquemas de purificación existentes y/o sustituir una o más operaciones unitarias dentro de esquemas de purificación existentes. En particular, los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento reducen los niveles de contaminantes hasta tal punto que el procesamiento y/o la purificación corriente abajo de la molécula pueden proceder sin necesidad de procesos adicionales de precipitación de impurezas y de clarificación/filtración del precipitado. Los procedimientos divulgados en el presente documento son de uso particular en procesos de separación y/o purificación para biomoléculas. Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento se pueden usar en cualquier proceso para la separación/purificación/aislamiento de una molécula de interés de una solución. La reducción sustancial de niveles de contaminante/impurezas permitida por los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento también son relevantes para cualquier proceso en el que los niveles de contaminantes/impurezas afecten negativamente al rendimiento del proceso y/o la función de operación unitaria. Por ejemplo, el procedimiento de TFF de dos fases se puede usar corriente arriba de una cromatografía de afinidad, por ejemplo, una columna de proteína A, u operaciones unitarias de cromatografía de intercambio iónico para proteger (por medio de una carga de impurezas reducida), por ejemplo, la molécula de afinidad, por ejemplo, proteína A, o la resina de cromatografía para prolongar su vida útil efectiva. En determinados modos de realización, los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento pueden sustituir una o más operaciones unitarias en esquemas de purificación existentes, por ejemplo, cromatografía de afinidad y, por tanto, se pueden usar en la purificación/aislamiento/separación sin afinidad de una biomolécula, por ejemplo, un anticuerpo, de una solución que contiene la biomolécula. En otros modos de realización, los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento se pueden usar en procesos que también comprenden cromatografía de afinidad, por ejemplo, cromatografía con proteína A.

Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento reducen los niveles de contaminantes/impurezas de modo que los procesos de purificación corriente abajo pueden proceder sin el uso de un proceso intermedio de precipitación y clarificación, por ejemplo, un proceso de precipitación y clarificación, por ejemplo, antes de la cromatografía de intercambio catiónico (CEX). En determinados modos de realización, los procedimientos de TFF de dos fases también pueden sustituir una o más operaciones unitarias de procesos de purificación tradicionales, por ejemplo, cromatografía de afinidad. En consecuencia, los procedimientos de la invención pueden dar como resultado ahorros sustanciales tanto de los costes directos como de los costes indirectos asociados con cualquier corriente de producción, procesamiento y/o purificación. Con respecto a los costes directos, los procedimientos de TFF de dos fases de la invención pueden reemplazar, en determinados modos de realización, procedimientos de cromatografía basados en afinidad. Debido a que las membranas de filtración cuestan sustancialmente menos que los materiales de cromatografía basada en afinidad (por ejemplo, para suministrar una columna industrial típica, cuestan al menos  $\frac{1}{4}$  menos) y presentan tiempos de vida útil más prolongados, el uso de los procedimientos de TFF de dos fases basados en membranas puede ahorrar directamente costes de materiales para esta etapa de purificación inicial. Además, el uso de la cromatografía de afinidad también está asociado con una gran cantidad de costes indirectos, incluyendo la preparación cuidadosa del material de carga para garantizar la compatibilidad con el material de afinidad; la monitorización de la lixiviación del material de afinidad; y tiempos de parada de proceso para regenerar el material de afinidad. Además, debido a que los parámetros de los tampones de unión y/o elución para la cromatografía de afinidad pueden ser incompatibles con procesos corriente abajo, la corriente de producto puede requerir otras operaciones unitarias tales como intercambio de tampones antes de etapas adicionales de purificación/pulido corriente abajo, tales como cromatografía de intercambio iónico. Cada uno de estos costes adicionales se ahorraría indirectamente mediante el uso de los procedimientos de TFF de dos fases de la invención. Los procedimientos de TFF de dos fases de la presente invención se basan en el tamaño, no siendo el rendimiento de la membrana tan sensible a los parámetros de la corriente de alimentación, y no requieren

monitorización porque no puede ocurrir lixiviación. Además, es posible procesar/purificar la molécula de interés en la corriente de alimentación mientras se procesan simultáneamente los parámetros de la solución de la corriente de manera que cualquier corriente de salida sea totalmente compatible con los procesos corriente abajo, por ejemplo, CEX, con un procesamiento adicional mínimo.

Se conocen procedimientos para la separación de una molécula de interés de una solución que contiene la molécula en función de su tamaño, por ejemplo, el peso molecular. Los procedimientos más ampliamente practicados de este tipo son los procesos de filtración por membrana. Actualmente, hay dos procedimientos principales de filtración de membrana: Filtración de paso único o de flujo directo (DFF) y filtración de flujo cruzado o de flujo tangencial (TFF). Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento se refieren específicamente a la TFF. La TFF es un sistema de ultrafiltración que se distingue de la DFF en que el flujo de la solución que se va a filtrar no es forzado perpendicular a la membrana como en la DFF, sino que procede paralelo a la membrana de filtro. La TFF se ha diseñado para controlar el patrón de flujo de fluido de una corriente de alimentación para mejorar el transporte del(de los) soluto(s) retenido(s) lejos de la superficie de la membrana y de vuelta al grueso de la alimentación.

En la TFF, la corriente que contiene la molécula de interés se pasa por la membrana a altas velocidades en un vector tangencial al plano de la membrana. Durante la TFF, se aplica un diferencial de presión a lo largo de la longitud de la membrana para hacer que el fluido y los solutos filtrables fluyan a través del filtro. Esto se hace para aumentar el coeficiente de transferencia de masa para permitir la retrodifusión. El fluido que fluye en una dirección paralela a la membrana de filtro también actúa para limpiar continuamente la superficie del filtro y, de este modo, evita la obstrucción. La solución retenida (retenido) se puede reincorporar a la circulación y pasar repetidamente sobre la membrana, mientras que el fluido que pasa a través del filtro (permeado) se extrae continuamente a una unidad separada. De acuerdo con los procedimientos de la invención que se describen en el presente documento, dependiendo del valor de corte, tamaño de poro u otro parámetro de permeabilidad del filtro, la molécula de interés se puede encontrar en el permeado o el retenido de la operación unitaria de TFF individual y, por tanto, se puede recoger el permeado o el retenido de cualquier operación unitaria de TFF para su procesamiento corriente abajo de acuerdo con los procedimientos de TFF de dos fases descritos en el presente documento o el procesamiento corriente abajo posterior a los procedimientos de TFF de dos fases. Como entiende un experto en la técnica, la operación de TFF rara vez es completamente eficaz. Es decir, un pequeño porcentaje de las moléculas que se prevé por diseño que se retengan en el retenido de la operación unitaria de TFF puede pasar, sin embargo, a través de la membrana de filtro que se encuentra en el permeado; de manera similar, una pequeña cantidad de las moléculas que se prevé que pasen a través de la membrana en el permeado de la operación unitaria de TFF pueden ser retenidas, sin embargo, por la membrana y permanecer en el retenido. En consecuencia, en relación con la operación de una operación unitaria de TFF, el uso de los términos "no pasa a través de la membrana" y "se encuentra en el retenido" no se debe interpretar como absoluto, sino que indican que al menos un 90 % de la molécula de interés aplicada a la operación unitaria de TFF se recupera en el retenido. Del mismo modo, los términos "no pasa a través de la membrana" y "se encuentra en el permeado" tampoco se deben interpretar como absolutos, sino que indican que al menos un 90 % de la molécula de interés aplicada a la operación unitaria de TFF se recupera en el permeado.

El uso y la implementación de las operaciones unitarias de TFF son bien conocidos en la técnica. Se ha demostrado que los procedimientos de TFF son útiles en la filtración de componentes sanguíneos (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.888.115), en la producción de alimentos (por ejemplo, cerveza, documento EP-A2 0.208.450), en la purificación de inmunoglobulinas de la leche o calostro (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.644.056) y en la separación de sustancias antivíricas tales como cultivos celulares de producción de interferones (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.420.398). En consecuencia, cualquier procedimiento divulgado en el presente documento o conocido en la técnica se puede usar para efectuar las operaciones unitarias de TFF individuales de los procedimientos divulgados en el presente documento. La presente divulgación del uso de los procedimientos de TFF de dos fases de la invención no engloba el procesamiento de leche o soluciones fraccionadas de leche, por ejemplo, soluciones/fracciones de leche ricas en caseína o pobres en caseína, aislado de proteína de suero de leche, etc. En consecuencia, las corrientes de alimentación o las corrientes de producto englobadas por los procedimientos de la presente invención no son leche o soluciones fraccionadas de leche.

Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento comprenden el uso de al menos dos operaciones unitarias de TFF (es decir, una primera y una segunda operación unitaria de TFF) que separan la molécula de interés en función del tamaño de la molécula.

La primera operación unitaria de TFF del procedimiento de TFF de dos fases divulgado en el presente documento se caracteriza por filtrar una primera corriente de producto que contiene la molécula de interés, de manera que la molécula se pueda recuperar o se recupere en el retenido de la operación unitaria de TFF. La retención de la molécula de interés en el retenido de la operación unitaria de TFF se efectúa mediante la selección de la membrana de ultrafiltración de manera que sea impermeable a la molécula de interés. Aunque la selección se puede basar en el tamaño real o efectivo de la molécula de interés, por ejemplo, seleccionando una membrana con un valor de corte o tamaño de poro menor que el tamaño real o efectivo, como se reconoce en la técnica, el rendimiento de la membrana puede depender de otros factores (por ejemplo, carga de la membrana). Por lo tanto, las membranas que tiene valores de corte o tamaños de poro notificados mayores que el tamaño de la molécula de interés pueden ser, sin embargo, funcionalmente impermeables a la molécula durante la operación unitaria de TFF. En consecuencia, la primera

operación unitaria de TFF se caracteriza por comprender el uso de una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte que es menor que el peso molecular de la molécula de interés y/o se caracteriza por que la molécula no puede pasar a través de la membrana durante la primera operación unitaria de TFF. En modos de realización específicos, la membrana de ultrafiltración de la primera operación unitaria de TFF tiene un valor de corte que no es mayor de la mitad del peso molecular de la molécula de interés; es decir, un valor de corte de 0,5 veces el peso molecular de la molécula de interés o menos.

La segunda operación unitaria de TFF del procedimiento de TFF de dos fases divulgado en el presente documento se caracteriza por filtrar una segunda corriente de producto que contiene la molécula de interés, de manera que la molécula se pueda recuperar o se recupere en el permeado de la operación unitaria de TFF. La recuperación de la molécula de interés en el permeado de la operación unitaria de TFF se efectúa mediante la selección de la membrana de ultrafiltración de manera que sea libremente permeable a la molécula de interés. Aunque la selección se puede basar en el tamaño real o efectivo de la molécula de interés, por ejemplo, seleccionando una membrana con un valor de corte o tamaño de poro mayor que el tamaño real o efectivo, como se reconoce en la técnica, el rendimiento de la membrana puede depender de otros factores (por ejemplo, carga de la membrana). Por lo tanto, la segunda operación unitaria de TFF del procedimiento de TFF de dos fases divulgado en el presente documento se caracteriza por comprender el uso de una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte que es mayor que el peso molecular de la molécula de interés y/o que se caracteriza por que la molécula de interés puede pasar a través de la membrana. En determinados modos de realización, la membrana de ultrafiltración tiene un valor de corte que es al menos dos veces el peso molecular de la molécula de interés; es decir, un valor de corte de 2 veces el peso molecular de la molécula de interés o mayor. Además, la presente invención se refiere a procedimientos que comprenden la ultrafiltración de moléculas; en consecuencia, el valor de corte de la segunda operación unitaria de TFF también está limitado por el intervalo de tamaño superior para ultrafiltración reconocido y/o aceptado en la técnica, 1000 kD.

Como se detalla a lo largo de la presente divulgación, en modos de realización preferentes, los procedimientos de la invención se refieren a la separación de una proteína, por ejemplo, inmunoglobulina, de una solución que contiene la proteína, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo celular que opcionalmente se ha clarificado y/o esterilizado, por ejemplo, filtrado a través de una membrana que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$ , preferentemente filtrado a través de una membrana que tiene un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con los procedimientos generales de la invención, los valores de corte de la primera y segunda operaciones unitarias de TFF se seleccionan para que sean menores y mayores que el peso molecular de la molécula de interés, respectivamente. Esto se entiende que da como resultado, en particular, una primera operación unitaria de TFF en la que la molécula de interés no pasa a través de la membrana de filtro, y una segunda operación unitaria de TFF en la que la molécula de interés sí pasa a través de la membrana de filtro. Sin embargo, debido a que el rendimiento de la membrana de filtración también puede depender de factores distintos del tamaño molecular estricto (por ejemplo, puede depender de la carga molecular), la presente divulgación no limita los criterios por los cuales las membranas se pueden seleccionar (siempre que la molécula de interés no pase a través de la membrana en la primera operación unitaria de TFF y no pase a través de la membrana de la segunda operación unitaria de TFF). Por tanto, en determinados modos de realización, los valores de corte de las membranas usadas de acuerdo con los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento se seleccionan en función del rendimiento de la membrana en lugar de basarse estrictamente en un valor de corte afirmado (por ejemplo, de acuerdo con las especificaciones del fabricante). Los procedimientos para determinar el rendimiento de la membrana y, específicamente, para determinar la permeabilidad de una membrana a una molécula de interés, por ejemplo, una proteína, son bien conocidos y se implementan rutinariamente en la técnica.

Se recalca que el uso de los términos "primera" y "segunda" como identificadores de al menos dos operaciones unitarias de TFF de los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento no implica orden. En otras palabras, los procedimientos divulgados actualmente no requieren que la primera operación unitaria de TFF (caracterizada por que la molécula de interés está en el retenido) esté corriente arriba de la segunda operación unitaria de TFF (caracterizada por que la molécula de interés está en el permeado). Más bien, los términos primera y segunda como se usan en el presente documento son simplemente identificadores que distinguen las al menos dos operaciones unitarias de TFF del procedimiento de TFF de dos fases divulgados en el presente documento. Por tanto, en determinados modos de realización divulgados en el presente documento, la segunda operación unitaria de TFF está corriente arriba de la primera operación unitaria. En modos de realización preferentes, la primera operación unitaria de TFF está corriente arriba de la segunda operación unitaria de TFF. En determinados modos de realización, la corriente de retenido de la primera operación unitaria de TFF forma la segunda corriente de producto de la segunda operación unitaria de TFF como se divulga en el presente documento. En otros modos de realización, una o más operaciones unitarias adicionales se pueden intercalar entre la primera y segunda operaciones unitarias de TFF.

En determinados modos de realización, los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento también pueden contener o comprender una o más operaciones unitarias de TFF además de las primera y segunda operaciones unitarias de TFF descritas en el presente documento. Las una o más operaciones unitarias de TFF adicionales pueden comprender el uso de una membrana de ultrafiltración idéntica a o diferente de la primera operación unitaria de TFF, o pueden comprender el uso de una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte diferente de la primera operación unitaria de TFF, siempre que el valor de corte sea menor que el peso molecular de la molécula de interés y/o sea tal que la molécula de interés no pueda pasar a través de la membrana.

En modos de realización específicos, la invención proporciona una tercera operación unitaria de TFF caracterizada por filtrar una tercera corriente de producto que contiene la molécula de interés, de manera que la molécula se pueda recuperar o se recupere en el retenido de la operación unitaria de TFF. Como tales, los criterios para la operación de la tercera operación unitaria de TFF de acuerdo con este modo de realización son los mismos que para la operación de la primera operación unitaria de TFF. En consecuencia, la tercera operación unitaria de TFF de acuerdo con este modo de realización se caracteriza por comprender el uso de una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte que es menor que el peso molecular de la molécula de interés y/o se caracteriza por que la molécula no puede pasar a través de la membrana durante la tercera operación unitaria de TFF. En modos de realización específicos, la membrana de ultrafiltración de la tercera operación unitaria de TFF tiene un valor de corte que no es mayor de la mitad del peso molecular de la molécula de interés; es decir, un valor de corte de 0,5 veces el peso molecular de la molécula de interés o menos.

Como se describe en este documento, la primera y la segunda operación unitaria de TFF se pueden combinar en cualquier orden. Por tanto, en el procedimiento de TFF de dos fases de la invención, la primera operación unitaria de TFF puede estar corriente arriba a la segunda operación unitaria de TFF, o la segunda operación unitaria de TFF puede estar corriente arriba de la primera operación unitaria de TFF. Además, los procedimientos de TFF de dos fases descritos en el presente documento también engloban el uso de una o más operaciones unidades de TFF además de las primera y segunda operaciones unitarias de TFF, por ejemplo, una tercera operación unitaria de TFF, pudiendo estar las operaciones unitarias de TFF adicionales corriente arriba, corriente abajo o intercaladas entre la primera y segunda operaciones unitarias de TFF. En un modo de realización preferente de la invención que comprende una tercera operación unitaria de TFF, la primera operación unitaria de TFF está corriente arriba de la segunda operación unitaria de TFF, que está corriente arriba de la tercera operación unitaria de TFF, en el que la tercera operación unitaria de TFF se caracteriza por comprender el uso de una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte que es menor que el peso molecular de la molécula de interés y/o se caracteriza por que la molécula no puede pasar a través de la membrana durante la tercera operación unitaria de TFF. De acuerdo con este modo de realización, las primera, segunda y tercera operaciones unitarias de TFF se pueden implementar directamente una después de la otra, o se pueden intercalar con una o más operaciones unitarias adicionales. En determinados modos de realización, la tercera operación unitaria de TFF se puede ejecutar en paralelo con la segunda operación unitaria de TFF o implementar después de completar la de la segunda operación unitaria de TFF.

Las primera y segunda operaciones unitarias y/o las segunda y tercera operaciones unitarias se pueden hacer funcionar inmediatamente corriente arriba/corriente abajo la una de la otra. Como se usa en el presente documento, las frases "se hace funcionar inmediatamente corriente arriba", "se hace funcionar directamente corriente abajo", "está inmediatamente corriente arriba", "está inmediatamente corriente abajo" y frases análogas no implican un componente cronológico; por tanto, por ejemplo, la primera y segunda operación unitaria de TFF o la segunda y tercera operación unitaria de TFF no necesitan ocurrir o proceder ambas dentro de un período de tiempo específico. Más bien, las frases indican que la corriente de producto no se procesa por ninguna otra operación unitaria entre la primera y segunda o entre la segunda y tercera operaciones unitarias; por tanto, por ejemplo, la primera operación unitaria de TFF se puede ejecutar en, por ejemplo, modo discontinuo, la corriente de producto almacenada y/o transportada y almacenada, y luego, en algún momento futuro, la corriente de producto se procesa por la segunda operación unitaria de TFF (siempre que no haya habido ninguna operación unitaria intermedia).

Aunque en determinados modos de realización los procedimientos de TFF de dos fases de la invención se contemplan para sustituir los procesos de cromatografía basados en afinidad en cualquier esquema de purificación o procesamiento, la invención también contempla procedimientos de purificación que comprenden tanto el proceso de TFF de dos fases de la invención como la purificación basada en afinidad. Por tanto, la invención contempla la combinación de procedimientos de TFF de dos fases y una o más etapas y/u operaciones unitarias de purificación adicionales, incluida cromatografía basada en afinidad, por ejemplo, cromatografía con proteína A o proteína G. Otras etapas u operaciones unitarias de purificación ejemplares incluyen procedimientos divulgados expresamente en el presente documento y/o los conocidos en la técnica, tales como cromatografía de afinidad que usa proteínas derivadas de microbios (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G como se indica), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) y cromatografía de intercambio de modo mixto), adsorción tiofílica (por ejemplo, con betamercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o de adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-sefarsosa, resinas aza-arenófilas, o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad con quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad con Ni(II)- y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos preparativos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102). Ejemplos adicionales de etapas u operaciones unitarias de purificación bien conocidas en la técnica incluyen cromatografía con hidroxilapatita; diálisis, cromatografía de afinidad que usa un anticuerpo para capturar la proteína, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de interacción de carga hidrófoba (HCIC), precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice, cromatoenfoque y filtración en gel.

La combinación de las al menos primera y segunda operaciones unitarias de TFF de acuerdo con los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento no solo separa la molécula de interés de los componentes

no deseados de la solución que comprende la molécula de interés, sino que también reduce significativamente los contaminantes que, de lo contrario, pueden interferir en procesos corriente abajo. Por tanto, los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento proporcionan procesamiento de una variedad de corrientes de entrada y dan como resultado una corriente de producto de salida que se puede procesar además mediante procedimientos de purificación corriente abajo conocidos en la técnica de una manera acelerada, eficiente y económica. En particular, los procedimientos de TFF de dos fases reducen significativamente el contaminante y las impurezas de la corriente del producto sin el uso de operaciones unitarias costosas tales como precipitaciones y filtraciones de precipitados. De manera preliminar, se reconoce en la técnica que los procesos de precipitación no son deseados y dan lugar a una disminución de los rendimientos porque no es posible recuperar la solución de producto de las fracciones del precipitado. Además de disminuir los rendimientos, las operaciones unitarias de precipitados y filtración de precipitados dan como resultado aumentos de los costes directos debido a factores que incluyen, pero no se limitan a, un aumento del tiempo de procesamiento (por ejemplo, el tiempo requerido para la formación y filtración de precipitados), un aumento de los costes de energía (por ejemplo, refrigeración durante la precipitación) y un aumento de los costes de equipos (por ejemplo, grandes tanques de retención para reacciones de precipitación). En consecuencia, la eliminación potencial de operaciones unitarias de precipitación corriente abajo que usan las operaciones unitarias de TFF de dos fases de la presente invención da como resultado ventajas económicas significativas que incluyen un aumento de los rendimientos de procesamiento, una disminución del tiempo de procesamiento y la eliminación de costes fijos (por ejemplo, asociados con las operaciones unitarias de precipitación). Además, la reducción sustancial de los niveles de impurezas/contaminantes puede ofrecer otras ventajas económicas a los procesos corriente abajo tales como los procesos cromatográficos. Por ejemplo, la reducción de contaminantes de los procedimientos de TFF de dos fases puede mejorar el rendimiento de la columna corriente abajo (por ejemplo, por medio de una unión dinámica mejorada, menos colmatación), aumentar el tiempo de procesamiento (por ejemplo, permitir una mayor velocidad de flujo) y mejorar la vida útil de la columna. Además, como se ejemplifica en el presente documento, la reducción sustancial de la carga de contaminantes para procesos corriente abajo permite el uso de columnas cromatográficas más pequeñas sin riesgo de sobrecarga, lo que da como resultado mayores ventajas económicas. Por lo tanto, los procedimientos de TFF de dos fase de la presente invención ofrecen múltiples ventajas económicas para procesos que comprenden su uso.

En determinados modos de realización, las moléculas de interés son biomoléculas producidas a partir de células de mamíferos, cultivos de microorganismos y/o animales (todos los cuales pueden ser transgénicos o no), separándose dichas biomoléculas de una solución de cultivo o un fluido corporal del animal. De forma alternativa, las moléculas de interés pueden ser biomoléculas producidas en un sistema *in vitro* basado en reacciones y vías bioquímicas y se deben separar de los componentes del sistema *in vitro*, por ejemplo, enzimas y empezar materialmente, usados para fabricar la biomolécula. En modos de realización preferentes, la molécula de interés es una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, que se va a separar de una solución de cultivo celular (por ejemplo, un sobrenadante de cultivo celular opcionalmente filtrado a través de una membrana de 0,22 µm).

Los procedimientos divulgados en el presente documento comprenden el uso de operaciones unitarias de TFF que tienen membranas de ultrafiltración. Como se define en la técnica, la ultrafiltración típicamente implica el uso de membranas que tienen tamaños de poros que varían de 0,001 a 0,1 µm. Adicionalmente o de forma alternativa, las membranas de ultrafiltración se pueden clasificar de acuerdo con el valor de corte en kD, que es el peso molecular aproximado máximo que puede pasar libremente a través de la membrana. Es sabido que las membranas de ultrafiltración son útiles en la separación de, incluyendo, pero no limitado a, proteínas, polipéptidos, coloides, inmunoglobulinas, proteínas de fusión, fragmentos de inmunoglobulina, micoplasma, endotoxinas, virus, aminoácidos, ADN, ARN e hidratos de carbono.

Los procedimientos divulgados en el presente documento no se limitan a ninguna membrana de ultrafiltración específica, ya que se conocen varios tipos de membrana, se pueden comprar comercialmente y/o se pueden producir de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica, de manera que tenga el valor de corte de peso molecular deseado y no adsorba la molécula de interés (por ejemplo, proteína, anticuerpo, etc.). Los ejemplos de las membranas de ultrafiltración adecuadas para los procedimientos de la presente invención incluyen membranas formadas a partir de celulosa y derivados celulósicos como acetato de celulosa (CA), polisulfona (PS), polietersulfona (PES), polifluoruro de vinilideno (PVDF), poliamida (PA) y/o poliácridonitrilo (PAN).

En determinados modos de realización, al menos una de las al menos dos operaciones unitarias de TFF de los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento es la filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (HPTFF). La HPTFF es una operación unitaria bidimensional que separa solutos de proteínas en función tanto del tamaño como de la carga, lo que permite la separación de especies de proteínas que difieren en menos de 10 veces su tamaño. La distinción principal entre las operaciones unitarias de TFF y HPTFF es el uso de membranas cargadas en esta última (en particular, que tienen la misma polaridad que las especies que se desean recuperar en el retenido de la operación unitaria). Como es conocido en la técnica, la HPTFF obtiene una alta selectividad mediante una cuidadosa modulación del pH del tampón y la fuerza iónica para maximizar las diferencias en el volumen efectivo de diferentes especies cargadas en la corriente de producto/alimentación. Esto se realiza controlando cuidadosamente el flujo de permeado y la sustitución/diafiltración del tampón durante la operación. El volumen efectivo de una proteína cargada (por ejemplo, como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño) explica la presencia de una doble capa eléctrica difusa que rodea la proteína. Aumentar la carga de la proteína, o reducir la fuerza iónica de la

solución, aumenta el volumen efectivo de la proteína y, por tanto, reduce la transmisión de proteína a través de la membrana. Por tanto, la HPTFF afecta a las separaciones aprovechando las diferencias tanto en tamaño como en carga, determinándose la magnitud de las contribuciones por las propiedades de la proteína, la membrana y las condiciones del tampón. La separación óptima típicamente se logra operando cerca (1) del punto isoeléctrico de la especie que va a permear (de filtrar a través de) la membrana, y (2) a una concentración relativamente baja de sal para maximizar las interacciones electrostáticas. Los efectos de la carga directa también se pueden aprovechar seleccionando membranas de filtro con perfiles de carga favorables en relación con las especies que se desean retener y/o filtrar en condiciones operativas (véase, por ejemplo, Zydney y Kuriyel, *Methods in Biotechnol.* 9 (2000), 35-46; Lebreton et al., *Biotechnol. Bioeng.* 2008(100), 964-974 y patente de EE. UU. 5.256.294).

Como se divulga en el presente documento, el procedimiento de TFF de dos fases requiere el uso de al menos dos operaciones unitarias de TFF, que comprenden (1) una primera operación unitaria de TFF que filtra una primera corriente de producto de manera que la molécula de interés, por ejemplo, proteína, se recupera en el retenido de la operación unitaria de TFF; y (2) una segunda operación unitaria de TFF que filtra una segunda corriente de producto de manera que la molécula de interés, por ejemplo, proteína, se recupera en el permeado de la operación unitaria de TFF. En determinados modos de realización, los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento se pueden caracterizar por que (1) la primera operación unitaria de TFF comprende una membrana de ultrafiltración con un valor de corte que es menor que el peso molecular de la molécula de interés (en modos de realización preferentes como máximo la mitad del peso molecular de la molécula de interés (es decir, un valor de corte de 0,5 veces el peso molecular de la molécula de interés o menos)) y/o una membrana de ultrafiltración que se caracteriza por que la molécula de interés no pasa a través de la membrana durante la primera operación unitaria de TFF; y (2) la segunda operación unitaria de TFF comprende una membrana de ultrafiltración con un valor de corte que es mayor que el peso molecular de la molécula de interés (en modos de realización preferentes, al menos dos veces el peso molecular de la molécula de interés o mayor (es decir, un valor de corte al menos 2 veces el peso molecular de la molécula de interés o mayor, pero menos de 1000 kD) y/o una membrana de ultrafiltración que se caracteriza por que la molécula de interés pasa a través de la membrana durante la segunda operación unitaria de TFF. Las membranas de ultrafiltración para su uso de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento no están limitadas de otra manera y pueden ser de cualquier material o tener cualquier valor de corte siempre que cumplan los amplios criterios de exclusión establecidos en el presente documento (es decir, valor de corte de la membrana en la primera operación unitaria de TFF de manera que la molécula de interés no pase a través de la membrana durante la operación unitaria de TFF; y valor de corte de la membrana en la segunda operación unitaria de TFF de manera que la molécula de interés no pase a través de la membrana durante la operación unitaria de TFF). Se pueden preparar membranas de diversos materiales, intervalos de corte, tamaños de poro y perfiles de permeabilidad mediante procedimientos de rutina conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2010/0190965) y/o se pueden obtener comercialmente. Por ejemplo, Pall GmbH (Dreieich, Alemania) ofrece membranas de ultrafiltración que tienen valores de corte de 1, 5, 10, 30, 50, 70, 100 y 300 kD; Satorius AG (Goetting, Alemania) ofrece membranas de ultrafiltración que tienen valores de corte de 1, 2, 3, 5, 10, 30, 50, 100 y 300 kD; EMD Millipore (MA, EE. UU.) ofrece membranas de ultrafiltración que tienen valores de corte de 1, 3, 5, 10, 30, 100, 300, 500 y 1000 kD; y Novasep (Pompey, Francia) ofrece membranas de ultrafiltración que tienen valores de corte de 1, 3, 5, 10, 30, 50, 70, 100 y 300 kD.

Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento están bien adaptados para su uso a escala comercial. Los procedimientos se pueden ejecutar en operaciones discontinuas o continuas, o de manera semicontinua, por ejemplo, con un flujo continuo de solución que contiene las especies deseadas, más allá de las al menos dos operaciones unitarias de TFF, hasta que un lote grande completo se haya filtrado de este modo (con una o más etapas de lavado opcionales interpuestas entre las etapas de filtración). De esta manera, se puede llevar a cabo un proceso de ciclo continuo para dar grandes rendimientos del producto deseado, en una forma aceptablemente pura, durante períodos de tiempo relativamente cortos.

En determinados modos de realización, las operaciones unitarias de TFF individuales de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento se pueden combinar con diafiltración. La diafiltración es un proceso de fraccionamiento que comprende lavar moléculas más pequeñas a través de la membrana de filtro de TFF, dejando las moléculas más grandes en el retenido. Es una técnica cómoda y eficiente para concentrar la molécula de interés y/o eliminar o intercambiar sales, eliminar detergentes, separar moléculas libre de las unidas, eliminar materiales de bajo peso molecular o cambiar rápidamente el entorno iónico o de pH. Típicamente, la diafiltración se usa para el intercambio de tampón en el que la molécula de interés permanece en el retenido. La diafiltración se puede combinar con y/o usar en cualquier operación unitaria de TFF de los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento. Por ejemplo, la diafiltración se puede usar en la operación unitaria de TFF más corriente arriba del procedimiento de TFF de dos fases, por ejemplo, para reemplazar los componentes de la corriente de alimentación con un tampón adecuado para su procesamiento posterior (véase, por ejemplo, la figura 1). De forma alternativa o adicionalmente, la diafiltración puede ser en más de una de las operaciones unitarias de TFF del procedimiento de TFF de dos fases, por ejemplo, durante la concentración y/o para realizar múltiples intercambios de tampón a lo largo del proceso (véase, por ejemplo, la figura 2). Los procesos de diafiltración son bien conocidos y se usan habitualmente en la técnica y se pueden implementar mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento.

Los procedimientos divulgados en el presente documento son particularmente adecuados para la eliminación de contaminantes de las corrientes de alimentación de los procesos de producción de proteínas recombinantes. Específicamente, los procedimientos divulgados son de uso particular en el procesamiento de una proteína de una solución de cultivo celular y pueden reducir los contaminantes/impurezas comunes HCP y HCDNA, de manera que se reduce o elimina la precipitación de HCP y HCDNA durante el procesamiento corriente abajo. En particular, los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento reducen los niveles de carga de HCP y HCDNA de una corriente de producto (por ejemplo, solución de cultivo celular tal como sobrenadante de cultivo celular) de manera que la corriente de producto se puede ajustar antes de un proceso corriente abajo, por ejemplo, CEX, sin precipitación de HCP y/o HCDNA. En modos de realización particulares en relación con el procesamiento de una proteína de una solución de cultivo celular, los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento reducen los niveles de carga de HCP y HCDNA de la corriente de producto, de manera que la solución se puede ajustar a un pH de aproximadamente 5 sin precipitación de HCP y/o HCDNA.

En determinados modos de realización en relación con la separación de una proteína de una solución de cultivo celular (por ejemplo, un sobrenadante de cultivo celular opcionalmente filtrado a través de una membrana que tiene un tamaño de poro de 0,1  $\mu\text{m}$  a 0,45  $\mu\text{m}$ ), los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento pueden reducir la carga de HCDNA en la corriente de alimentación en bruto (es decir, solución de cultivo celular inicial antes de cualquier operación unitaria excluyendo una filtración opcional a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,1  $\mu\text{m}$  a 0,45  $\mu\text{m}$ ), en al menos un 50 %. En otras palabras, la concentración de HCDNA en la solución que contiene la proteína de interés subsiguiente a y/o resultante de un procedimiento de TFF de dos fases divulgado en el presente documento se puede reducir en al menos un 50 % con respecto a la concentración de HCDNA en la solución de cultivo celular en bruto antes de la operación del procedimiento de TFF de dos fases. Los procedimientos de la invención también han demostrado una mayor eficacia en la reducción de las cargas de HCDNA y, en determinados modos de realización, pueden reducir la concentración de HCDNA en la solución que contiene la molécula de interés en al menos un 90 % o un 95 %. En consecuencia, los procedimientos divulgados en el presente documento pueden reducir la concentración de HCDNA en la solución que contiene la molécula de interés en al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %.

En determinados modos de realización en relación con la separación de una proteína de una solución de cultivo celular (por ejemplo, un sobrenadante de cultivo celular opcionalmente filtrado a través de una membrana que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$ ), los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento pueden reducir la carga de HCP en la corriente de alimentación en bruto (es decir, solución de cultivo celular inicial antes de cualquier operación unitaria excluyendo una filtración opcional a través de una membrana que tiene un tamaño de poro de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$ ), en al menos un 10 %. En otras palabras, la concentración de HCP en la solución que contiene la proteína de interés subsiguiente y/o resultante de un procedimiento de TFF de dos fases divulgado en el presente documento se puede reducir en al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 % o al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 % o al menos un 50 % con respecto a la concentración de HCP en la solución de cultivo celular antes de la operación de los procedimientos de TFF de dos fases de la invención.

En determinados modos de realización, en los que la molécula de interés es una proteína (por ejemplo, anticuerpo) y la corriente de alimentación es un sobrenadante de cultivo celular, la carga de HCP de la solución que contiene la molécula resultante de y/o posterior a la implementación de un procedimiento de TFF de dos fases divulgado en el presente documento es 450 000 ng por mg de proteína o menos, y la carga de HCDNA en la solución resultante es 600 000 pg por mg de proteína o menos.

El anticuerpo de acuerdo con la presente invención se produce preferentemente por medios recombinantes. Los procedimientos generales para la producción recombinante de anticuerpos se conocen bien en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procariotas o eucariotas (véanse, por ejemplo, las siguientes revisiones: Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17, 183-202 (1999); Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-160; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880). Los procedimientos de acuerdo con la presente invención son, en principio, adecuados para la producción de cualquier anticuerpo. En un modo de realización, las inmunoglobulinas producidas con el procedimiento de acuerdo con la invención son inmunoglobulinas recombinantes. En otros modos de realización, las inmunoglobulinas son inmunoglobulinas humanizadas, inmunoglobulinas quiméricas, inmunoglobulinas humanas, fragmentos de inmunoglobulina o conjugados de inmunoglobulina. En otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y policlonal. En un modo de realización preferente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos producidos por los procedimientos de acuerdo con la presente invención pueden ser anticuerpos terapéuticos o de diagnóstico. En un modo de realización, los anticuerpos son anticuerpos terapéuticos. Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos incluyen un anticuerpo dirigido a un antígeno tumoral (por ejemplo, receptores de factores de crecimiento y factores de crecimiento) tal como EGFR, HER3, HER4, Ep-CAM, CEA, TRAIL, receptor 1 de TRAIL, receptor 2 de TRAIL, receptor de linfotóxina beta, CCR4, CD19, CD20, CD22, CD28, CD33, CD40, CD80, CSF-IR, CTLA-4, proteína de activación de fibroblastos (FAP), hepsina, proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor de VEGF 1, receptor de VEGF 2, IGF1-R, TSLP-R, PDGF-R, TIE-I, TIE-2, TNF-alfa, inductor débil de apoptosis similar a TNF (TWEAK), IL-IR, VEGF,

EGF, PDGF, HGF y angiopoyetina. El anticuerpo de acuerdo con la presente invención también puede ser alemtuzumab, apolizumab, cetuximab, epratuzumab, galiximab, gemtuzumab, ipilimumab, labetuzumab, panitumumab, rituximab, nimotuzumab, mapatumumab, matuzumab, pertuzumab o ING-I.

5 En determinados modos de realización, la molécula de interés es una proteína que tiene un peso molecular de  $150 \pm 75$  kD (por ejemplo,  $150 \pm 30$  kD o  $150 \pm 15$  kD), y la TFF de dos fases comprende el uso de una primera operación unitaria de TFF con una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD; una segunda operación unitaria de TFF con una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 300 kD; y una tercera operación unitaria de TFF opcional con una membrana de ultrafiltración que tiene un corte de 50 kD. El uso de una  
10 membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD elimina los ácidos nucleicos bicatenarios que tienen un tamaño inferior a 240-475 pares de bases del retenido (que contiene proteínas de interés); el uso de una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 300 kD elimina el ácido nucleico bicatenario que tiene un tamaño mayor de 1450-2900 pares de bases del permeado (que contiene la proteína de interés; es decir, los ácidos nucleicos bicatenarios que tienen un tamaño mayor de 1450-2900 pares de bases se retienen dentro del retenido de TFF  
15 mientras que la molécula de interés pasa a través de la membrana y se puede recoger del permeado). Cuando la tercera operación unitaria de TFF opcional está corriente abajo de la primera y segunda operaciones unitarias de TFF, la tercera operación unitaria de TFF opcional se puede usar para concentrar la proteína de la solución de permeado que resulta de la segunda operación unitaria de TFF.

20 Para todos los modos de realización divulgados en el presente documento, la tercera operación unitaria de TFF opcional puede comprender el uso de una membrana de ultrafiltración idéntica o diferente de la usada en la primera operación unitaria de TFF; es decir, caracterizada por tener un valor de corte menor que el peso molecular de la proteína de interés y/o caracterizada por que la proteína no pasa a través de la membrana y se puede recuperar en el retenido hasta la tercera operación unitaria de TFF. En determinados modos de realización, la tercera operación  
25 unitaria de TFF se caracteriza por comprender una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte que no es más que 0,5 veces el peso molecular de la proteína de interés se caracteriza por comprender una membrana de ultrafiltración que no permite que la proteína de interés pase a su través durante la operación. Al igual que con los descriptores "primera" y "segunda" usados en relación con una operación unitaria de TFF de la presente invención, el descriptor "tercera" en relación con una operación unitaria de TFF de acuerdo con los presentes procedimientos de TFF de dos fases no implica ningún orden limitativo a la implementación de la operación unitaria de TFF individual en el procedimiento divulgado; es decir, la tercera operación unitaria de TFF no necesita necesariamente seguir, es decir,  
30 estar corriente abajo, de las primera y segunda operaciones unitarias de TFF como se divulgan en el presente documento. Más bien, la tercera operación unitaria de TFF puede estar corriente arriba de la primera operación unitaria de TFF, corriente arriba de la segunda operación unitaria de TFF, o puede estar corriente arriba de la primera y segunda operación unitaria de TFF. De forma alternativa o adicionalmente, la tercera operación unitaria de TFF puede estar corriente abajo de la primera operación unitaria de TFF, corriente abajo de la segunda operación unitaria de TFF, o puede estar corriente abajo de la primera y segunda operación unitaria de TFF. En modos de realización preferentes, el procedimiento de TFF de dos fases comprende el uso de una primera operación unitaria de TFF, una segunda operación unitaria de TFF corriente abajo y una tercera operación unitaria de TFF que está corriente abajo tanto de la primera como de la segunda operación unitaria, en el que la tercera operación unitaria de TFF comprende el uso de una membrana de ultrafiltración que puede o no ser idéntica a la usada en la primera operación unitaria de TFF y/o que no es más de 0,5 veces el peso molecular de la proteína de interés.

45 En determinados modos de realización, la molécula de interés es una proteína que tiene un peso molecular de  $150 + 75$  kD, y la TFF de dos fases comprende el uso de una primera operación unitaria de TFF con una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 50 kD, una segunda operación unitaria de TFF corriente abajo con una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de 300 kD, y una tercera operación unitaria de TFF con una membrana de ultrafiltración que tiene un corte de 50 kD que está corriente abajo tanto de la primera como de la segunda operación unitaria de TFF. Las primera, segunda y/o tercera operaciones unitarias de TFF se pueden combinar con diafiltración. Las primera, segunda y/o tercera operaciones unitarias de TFF se pueden implementar de forma discontinua y seguir directamente una a la otra o se pueden implementar secuencialmente como un sistema de flujo continuo. Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento también engloban el uso de una o más operaciones unitarias intercaladas entre las primera, segunda y/o tercera operaciones unitarias de TFF de acuerdo con la invención. Una o más de las primera, segunda y/o tercera operaciones unitarias de TFF se  
50 puede hacer funcionar en paralelo con las otras operaciones unitarias de TFF de la invención o se pueden hacer funcionar en paralelo con una o más operaciones unitarias adicionales.

Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento conjuntamente con CEX corriente abajo ofrecen distintas ventajas para el procesamiento de proteínas en comparación con los procesos conocidos en la técnica, en particular, proporcionan ventajas para el posterior procesamiento/purificación de proteínas corriente abajo. Específicamente, en comparación con los procesos que comprenden una TFF de una sola fase, el procesamiento corriente abajo (por ejemplo, CEX) de corrientes de alimentación y/o producto que contienen la proteína de interés que se trataron de acuerdo con los procedimientos de la invención ofreció distintas ventajas económicas y de procesamiento. Por ejemplo, el procesamiento de un sobrenadante de cultivo celular que usa la TFF de dos fases de acuerdo con los presentes procedimientos eliminó sorprendentemente la necesidad de cualquier proceso de precipitación y filtración de precipitado antes de CEX. En cambio, el proceso que comprende un procedimiento de TFF  
65



de una sola fase requirió la inserción de una etapa adicional de precipitación/filtración de precipitado para eliminar los contaminantes HCDNA y HCP de la corriente de producto antes de CEX. En consecuencia, los procedimientos actualmente divulgados en el presente documento ofrecen las ventajas de ahorrar tiempo y dinero directos e indirectos durante el proceso de purificación corriente abajo.

El requisito de precipitación/filtración de precipitado en procesos sin afinidad de la técnica anterior es resultado de que el procesamiento de TFF de una sola fase de acuerdo con procedimientos conocidos no puede eliminar de manera suficiente contaminantes (por ejemplo, HCP y/o HCDNA) de la corriente de muestra antes del procesamiento de cromatografía corriente abajo. Por ejemplo, el procesamiento/purificaciones de proteínas sin afinidad de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica típicamente usan AEX y/o CEX para refinar/purificar además una corriente de producto. Sin embargo, los niveles de contaminación resultantes de una TFF de una sola fase típicamente impiden el uso de AEX o CEX inmediatamente corriente abajo, debido a la sobrecarga de la capacidad de la columna (véanse, por ejemplo, los apartados de ejemplos del presente documento). Además, el hecho de no purificar suficientemente los contaminantes de la corriente de muestra también puede dar lugar a precipitación durante el ajuste de pH/tampón necesario antes de muchos procesos de purificación de cromatografía, por ejemplo, procesamiento de CEX. En consecuencia, los niveles de contaminantes en sí mismos y/o su precipitación durante procedimientos de procesamiento estándar pueden influir negativamente en los procesos de cromatografía usados en lugar de la purificación por afinidad. Sin embargo, la eliminación necesaria de contaminantes y, en particular, el precipitado resultante añade tiempo y costes significativos al proceso de purificación (por ejemplo, costes de refrigeración, ya que las precipitaciones industriales generalmente se realizan a una temperatura de 4 °C a 8 °C durante la noche). Los procesos de precipitación también tienen la desventaja de que la recuperación del producto puede ser pobre, dependiendo de la naturaleza y el volumen del precipitado. Por ejemplo, típicamente no es adecuado aplicar ni el precipitado ni el sobrenadante a un filtro de profundidad, debido a la inducción del bloqueo del filtro; por lo tanto, el producto soluble que está presente en la fracción de precipitado generalmente se pierde.

En cambio, los procedimientos de la presente invención (es decir, que comprenden TFF de dos fases como se divulga en el presente documento) sorprendentemente reducen los contaminantes de la corriente de producto a concentraciones que presentan un efecto mínimo o nulo en los procesos corriente abajo, por ejemplo, eliminando los procesos de precipitación/filtración de precipitado normalmente requeridos durante el ajuste del pH. Por ejemplo, usando el procesamiento de TFF de una sola fase de un sobrenadante de cultivo celular conocido en la técnica, el HCDNA se puede reducir en solo de un 17 a un 24 %; en cambio, los procedimientos de TFF de dos fases de la presente invención pueden reducir los niveles de HCDNA en un sobrenadante de cultivo celular en al menos un 85 % a un 92 %, y potencialmente mayor. De manera similar, usando el procesamiento de TFF de una sola fase conocido en la técnica, la HCP se puede reducir en un sobrenadante de cultivo celular en solo de un 0 a un 28 %; en cambio, los procedimientos de TFF de dos fases de la presente invención pueden reducir los niveles de HCP de un sobrenadante de cultivo celular en al menos un 17 a un 46 % o mayor.

Con respecto a los procesos individuales de los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento, la segunda operación unitaria de TFF puede proporcionar la mayor parte de la purificación de contaminantes de soluciones que contienen la molécula de interés, por ejemplo, proteína, en particular, cuando la corriente de alimentación al proceso es una solución de cultivo celular (es decir, un sobrenadante de cultivo celular). Por ejemplo, la operación de la segunda operación unitaria de TFF, es decir, caracterizada por que la molécula de interés se recupera en el permeado, en una corriente de alimentación de sobrenadante de cultivo celular puede eliminar al menos un 86 % de la carga de HCDNA y al menos un 22 % de la carga de HCP de la solución resultante que contiene la proteína de interés. La segunda operación unitaria de TFF también puede eliminar al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 % al menos un 85 % o al menos un 90 % de la carga de HCDNA en la solución que contiene la molécula de interés. La segunda operación unitaria de TFF también puede eliminar al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 % o al menos un 30 % de la carga de HCP en la solución que contiene la molécula de interés.

Como se divulga en el presente documento, la reducción significativa de los niveles de contaminantes de acuerdo con los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento tiene efectos significativos con respecto a los procesos tanto corriente abajo como corriente arriba. Por ejemplo, la eliminación robusta de contaminantes usando los procedimientos de TFF de dos fases divulgados en el presente documento hace que los procedimientos sean eficaces en un amplio intervalo de calidad de la corriente de alimentación, por ejemplo, eficaz en un amplio intervalo de niveles/concentraciones de contaminantes de la corriente de alimentación. Por tanto, los procedimientos divulgados en el presente documento se pueden implementar sin tener en cuenta la calidad de la corriente de alimentación (por ejemplo, la calidad del sobrenadante de cultivo celular acondicionado y clarificado) y pueden eliminar la dependencia del procesamiento corriente arriba para satisfacer los requisitos mínimos de calidad. De manera similar, la eliminación significativa de contaminantes también puede eliminar las consideraciones con respecto al procesamiento corriente abajo, tal como la capacidad de la columna de intercambio iónico, lo que permite un incremento del flujo y un mejor tiempo de procesamiento. El procesamiento de TFF de dos fases también exige menos tiempo en comparación con los procedimientos actuales conocidos en la técnica, por ejemplo, que comprenden etapas de precipitación y filtración de precipitado.

Las operaciones unitarias de TFF individuales que forman el procedimiento de TFF de dos fases de la presente divulgación (es decir, que comprenden una primera y una segunda operación unitaria de TFF y, opcionalmente, una o más terceras operaciones unitarias de TFF) se pueden unir en combinación para proporcionar un proceso de flujo continuo o se pueden realizar individualmente como operaciones discontinuas separadas. Las operaciones unitarias de TFF individuales de los procedimientos divulgados en el presente documento también se pueden unir en paralelo como se conoce en la técnica, por ejemplo, de manera que la corriente de producto de una operación alimente otra operación, haciendo recircular dicha corriente de producto a la operación original. El uso de las operaciones unitarias individuales en paralelo también puede mitigar los costes asociados con el aumento de las capacidades de almacenamiento y los tiempos de procesamiento.

Los procedimientos de TFF de dos fases divulgados actualmente se pueden ampliar directamente como se reconoce en la técnica. Esto permite su uso en cualquier proceso en el que se deseen procesos corriente abajo sin precipitación. Por ejemplo, la TFF de dos fases se puede implementar antes de cualquier etapa de cromatografía para aumentar el tiempo de vida útil de la columna. La drástica reducción de la carga de HCP y HCDNA puede dar como resultado un aumento de la vida útil de la columna a través de medios tanto directos como indirectos. De manera directa, los procedimientos de la invención reducen la cantidad de impurezas que entran en contacto con el adsorbente, evitando el bloqueo/colmatación del filtro. Indirectamente, la reducción de contaminantes puede permitir una reducción de la dureza de las condiciones de limpieza en circuito cerrado requeridas para la regeneración de la columna. Los procedimientos de la presente invención pueden encontrar un uso particular para la purificación de anticuerpos con fines de diagnóstico (no farmacéuticos).

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1:

#### Procesamiento de proteína de una solución usando TFF de una sola fase

El presente ejemplo se refiere al aislamiento y/o purificación de un anticuerpo de una solución que contiene el anticuerpo usando procedimientos de purificación sin afinidad, en particular, cromatografía de intercambio aniónico ("AEX") y cromatografía de intercambio catiónico ("CEX"). La solución inicial que contiene el anticuerpo es una corriente de alimentación de medios de cultivo celular acondicionado clarificado. La corriente de alimentación se preacondiciona usando una sola fase de filtración de flujo tangencial ("TFF") que tiene un valor de corte de 50 kD. El presente ejemplo se refiere a una práctica frecuente, usada habitualmente en la técnica durante el aislamiento sin afinidad de anticuerpos de corrientes de alimentación típicas (véase, por ejemplo, Gottschalk 2009; Alahari et al., BioPharm Int. 2 de marzo de 2009 (Supp.); Wang et al., BioPharm. Int. 2 de octubre de 2009). En particular, el anticuerpo se concentra primero (y se purifica parcialmente como se divulga en el presente documento) usando una sola fase de TFF que usa una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte por debajo del peso molecular del anticuerpo. El proceso de TFF va seguido por un intercambio de tampón/diafiltración antes de los procesos de cromatografía. Aunque es irrelevante para los procedimientos particulares divulgados y ejemplificados en el presente documento, el anticuerpo específico usado para este ejemplo fue un anticuerpo contra el receptor del factor estimulante de colonias 1 (anti-CSFRI; véase el documento WO 2011/131407).

#### Procedimientos:

##### **Filtración de flujo tangencial de una sola fase y diafiltración (producto en retenido)**

La filtración de flujo tangencial de una sola fase se realizó usando una unidad Satorius Sartocon Slice con Tandem Pump Modelo 1082 (Satorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Francia) y un Sartocon Slice Cassette PESU 50 kD (área de filtración 200 cm<sup>2</sup>, producto n.º 3081465002 E-SG; Satorius Stedim). En la fase única de TFF, se concentraron a 136 ml 945 ml de sobrenadante de cultivo celular clarificado (es decir, la corriente de alimentación) que contenía el anticuerpo de interés en una concentración de 2,9 mg/ml.

Posteriormente, se llevó a cabo un intercambio de tampón mediante diafiltración frente a un volumen 10 veces mayor de Tris/HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5. Las condiciones de TFF/diafiltración se seleccionaron de acuerdo con las prácticas estándar en la técnica. En particular, el valor de corte de la TFF de una sola fase, 50 kD, es ejemplar del valor de corte de 10 a 50 kD que se selecciona rutinariamente para concentrar el producto (es decir, la inmunoglobulina) mientras filtra proteínas de células huésped de bajo peso molecular, ADN y fragmentos de la corriente de producto.

##### **Cromatografía de intercambio aniónico**

La corriente de producto de la etapa de TFF/intercambio de tampón (es decir, el retenido) se sometió a cromatografía de intercambio aniónico ("AEX") de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica. Las condiciones de cromatografía fueron las siguientes:

Material de intercambio:	Q-Sepharose FF (GE Healthcare, Friburgo, Alemania)
Columna:	Diámetro interno de 8 mm, longitud de 100 mm, volumen de 5,03 ml
Caudal:	150 cm/h (1,25 ml/min)*
Solución de equilibrado:	Tris/HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5
Carga:	80 g de proteína/l de material de cromatografía
Solución de lavado:	Tris/HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5
Procedimiento de elución:	isocrático
(*) El caudal se redujo debido a un aumento de la contrapresión observada durante la carga y elución de la muestra.	

La muestra que contenía el anticuerpo (alimentación de producto o caudal de producto) se cargó en la columna de cromatografía como se indicó anteriormente. Después de cargar, la columna se lavó con solución de lavado y el anticuerpo se recuperó usando un procedimiento de elución isocrática (modo de flujo continuo).

5

#### **Ajuste de pH a 5,0**

Como se indicó anteriormente, el anticuerpo eluido de la columna de AEX estaba en un tampón que tenía un pH de 7,5. Para llevar a cabo la CEX posterior, el eluido que contenía el anticuerpo se ajustó a un pH de 5,0 mediante la adición de ácido cítrico 1 M.

10

Como se ha informado a menudo en la técnica, el ajuste del pH en esta etapa correspondiente en el procesamiento dio como resultado la precipitación de contaminantes de la alimentación, por ejemplo, proteínas de célula huésped ("HCP") y ADN de célula huésped ("HCDNA"; véase, por ejemplo, Gottschalk 2006; Anakumari et al., BioPharm Int. Feb. 2007 (Supp); Arunakumari et al., BioPharm. Int. 2 de marzo de 2009 (Supp); Arunakumari, Bioprocess Int. Febrero de 2009; Jue et al., BioPharm Int. Mar. 2, 2008 (Supp); Jue et al., BioPharm Int. 2 de octubre de 2009). Por lo tanto, antes de la CEX, la muestra se tenía que clarificar por centrifugación y filtración.

15

#### **Cromatografía de intercambio catiónico: Modo de unión y elución**

20

Después del ajuste del pH y la filtración, el anticuerpo se aisló de la corriente de producto usando CEX. Las condiciones de cromatografía fueron las siguientes.

Material de intercambio:	de	Poros 50HS (Life Technologies Co., Carlsbad, CA, EE. UU.)
Columna:		Diámetro interno de 8 mm, longitud de 100 mm, volumen de 5,03 ml
Caudal:		150 cm/h (= 1,25 ml/min)
Solución equilibrado:	de	Citrato de sodio 10 mM, pH 5,0
Carga:		40 g de proteína/l de material de cromatografía
Solución de lavado:		Citrato de sodio 10 mM, pH 5,0
Solución de elución:		Citrato de sodio 10 mM, NaCl 750 mM, pH 5,0
Procedimiento de elución:	de	gradiente lineal de un 0 % (v/v) a un 100 % (v/v) de solución de elución en 22,5 volúmenes de columna

Después de cargar la columna CEX como se indicó anteriormente, la columna se lavó con solución de lavado. El anticuerpo en forma monomérica se recuperó con un procedimiento de elución en gradiente lineal, por lo que el valor del pH se mantuvo constante y la conductividad se varió (aumentó) mediante la adición de cloruro de sodio.

25

#### **Determinación de anticuerpo y contaminantes**

30

Para las corrientes de producto inicial y final, así como en varias etapas intermedias del proceso de purificación (típicamente después de cada operación unitaria), se determinaron las concentraciones tanto del anticuerpo como de los contaminantes, las proteínas de célula huésped ("HCP") y el ADN de célula huésped ("HCDNA"). La concentración de anticuerpos para el sobrenadante de cultivo celular clarificado (corriente de alimentación inicial) y en todas las corrientes de producto intermedias se determinó mediante HPLC con proteína A (cromatografía líquida de alto

35

rendimiento por afinidad con proteína A; columna empleada: cartucho de sensor PA ImmunoDetection® para tecnología Perfusion Immunoassay™ de Applied Biosystems). La concentración de anticuerpo en la mezcla de eluido de la CEX se determinó mediante adsorción en el UV a 280 nm.

5 La proporción de anticuerpo monomérico se determinó mediante SE-HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño; columna empleada: TSK-GEL G3000SWXL; 7,8 mm de ID × 30,0 cm de L, 5 µm de Tosoh Bioscience).

10 La proteína de célula huésped (HCP) residual se determinó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas del tipo sándwich policlonal (ELISA). Brevemente, placas de microtitulación recubiertas previamente con estreptavidina se recubrieron con anticuerpos contra HCP de ovario de hámster chino (CHO) marcada con biotina por medio de la interacción biotina-estreptavidina y se incubaron con una solución de "anticuerpo de producto". La HCP unida se detectó mediante anticuerpos anti-HCP de CHO conjugados con digoxigenina combinados con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con peroxidasa de rábano picante. La HCP de CHO unido se visualizó añadiendo el sustrato ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). En paralelo a las mediciones de las soluciones de "anticuerpo de producto", se monitorizó una curva patrón.

20 Se utilizó un ensayo basado en q-PCR para la determinación cuantitativa del ADN de CHO. Se lisaron muestras (diluidas con tampón de ensayo si fuera necesario) en condiciones altamente desnaturizantes para garantizar el aislamiento del ADN intacto. El ADN aislado se unió a una membrana basada en gel de sílice y se separó del tampón restante y la matriz de la muestra mediante centrifugación. El ADN se eluyó en tampón de elución. Después de la desnaturalización por calor del ADN, el cebador directo e inverso se unió selectivamente a la secuencia diana. Entre los dos cebadores, una sonda de ADN de CHO específica de secuencia hibridó con el ADN diana.

25 La sonda se marcó con un colorante indicador fluorescente en el extremo 5' y con un colorante desactivador en el extremo 3'. Mientras la sonda permanezca intacta, la fluorescencia se desactiva debido a la proximidad relativa del colorante desactivador con respecto al colorante indicador. Durante la amplificación, la Taq-polimerasa hidroliza la sonda unida a la secuencia diana debido a su actividad exonucleasa 5'→3'. El colorante indicador se libera y el aumento de la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR. La cantidad de ADN en la muestra se cuantificó mediante una curva patrón externa.

30 Para el resultado final, la concentración de ADN de CHO medida se multiplicó por el factor de dilución de la muestra, si era aplicable, y se dividió entre la concentración de proteína.

### 35 **Resultados**

La concentración de anticuerpo, la proporción de monómero de anticuerpo y los niveles de contaminantes para la corriente de alimentación inicial, las corrientes de producto intermedias y el eluido final se proporcionan en la tabla 1. El rendimiento de las etapas proporciona el porcentaje de anticuerpo retenido para esa operación unitaria particular

40

Tabla 1

Muestra	Concentración de anticuerpo [mg/ml]	Rendimiento de las etapas (anticuerpo monomérico) [%]	Monómero SE-HPLC [%]	Nivel de HCP [ng/mg]	Nivel de HCDNA [pg/mg]
Sobrenadante de cultivo celular clarificado (fresco)	2,90	100	n.d.	245635	6982759
Valor de corte de 50 kD de TFF (retenido)	15,23	77	68,80	176162	5300722
Mezcla de elución de AEX, pH 7,5	9,2	90	72,9	62467	5546739
Mezcla de elución de AEX con ajuste de pH (pH 7,5 a 5,0), pH 5,0	9,2	24,6	73,41	24990	4272
Mezcla de elución de CEX	6,45	73	86,10	3049	74
<b>Rendimiento global</b>		<b>12 %</b>			

Muestra	Concentración de anticuerpo [mg/ml]	Rendimiento de las etapas (anticuerpo monomérico) [%]	Monómero SE-HPLC [%]	Nivel de HCP [ng/mg]	Nivel de HCDNA [pg/mg]
n.d. (no determinado)					

Como se informó anteriormente, la corriente de alimentación inicial fue de 945 ml de sobrenadante de cultivo celular clarificado que tenía una concentración de anticuerpo de 2,9 g/l. La carga de HCP fue de 245 635 ng/mg, la carga de HCDNA fue de 6 982 759 pg/mg.

5 Después de la TFF de una sola fase con un valor de corte de 50 kD y un intercambio de tampón/diafiltración, el rendimiento de las etapas calculado para el anticuerpo monomérico fue de aproximadamente un 77 % (es decir, un 77 % del anticuerpo monomérico en la alimentación aplicada se recuperó de la operación unitaria). El "pico de monómero" del retenido detectado por SE-HPLC fue de un 69 %. La TFF de una sola fase redujo la carga de HCP en la corriente de producto en un 28 % y la carga de HCDNA, en un 24 %.

10 La AEX posterior a TFF/diafiltración se hizo funcionar en modo de flujo continuo. La carga de la columna fue de 80 g/l. Durante la carga de la muestra en la columna de AEX, se observó un aumento drástico en la contrapresión de la columna. Sin embargo, el proceso de carga no se detuvo, sino que se continuó con un flujo volumétrico reducido. Se cree que el aumento de la contrapresión fue resultado de la alta concentración de HCDNA de la corriente de producto de alimentación (5 300 722 pg/mg), que sobrecargó la capacidad de la columna de AEX. Tomando como base los datos de ELISA de HCDNA, se calculó que la columna se enfrentó a 0,42 µg/ml de HCDNA (5 300 722 pg/mg de HCDNA × 80 mg/ml de carga). La prevención de la sobrecarga frente a concentraciones similares de HCDNA habría requerido una columna significativamente mayor.

15 El rendimiento de las etapas calculado para la AEX (anticuerpo monomérico) fue de un 90 % (es decir, un 90 % del anticuerpo monomérico de la solución de alimentación aplicada (de la TFF de una única fase/diafiltración) se recuperó después de esta operación unitaria). El "pico de monómero" detectado por SE-HPLC fue de un 73 %, ligeramente más alto en comparación con la muestra de alimentación (69 %). La operación unitaria de intercambio de tampón/AEX redujo la carga de HCP de la corriente de producto en un 65 %, mientras que la carga de HCDNA se incrementó ligeramente en un 5 %. Los datos de HCDNA ilustran que la etapa de AEX no contribuye significativamente al proceso de purificación con respecto al HCDNA, al menos en este experimento. La falta de purificación con respecto al HCDNA en este experimento se cree que se debe a la sobrecarga de la columna, cuya prevención podría remediarse teóricamente con el uso de una columna significativamente mayor.

20 Antes de la etapa de CEX, el pH de la corriente de producto se ajustó a 5,0. Se observó precipitación en la muestra en esta etapa. Se supuso que solo las impurezas precipitaban porque la concentración de anticuerpo de la corriente del producto no cambió con respecto al valor antes del ajuste del pH. Los precipitados se eliminaron por filtración. Sin embargo, la etapa de ajuste del pH/filtración se asoció con un bajo rendimiento del producto de solo un 25 %. Esto se atribuye a la pérdida volumétrica de la muestra durante la filtración a pequeña escala. Los extensos eventos de precipitación de impurezas probablemente den lugar a una disminución de la recuperación del producto (como se observa aquí), debido a pérdidas volumétricas durante una etapa correspondiente de precipitación y filtración. Sin embargo, se puede esperar que las pérdidas volumétricas correspondientes en un proceso a gran escala se reduzcan en comparación con los datos a pequeña escala presentados aquí.

25 Tras el ajuste del pH y la filtración, el "pico de monómero" del producto detectado por SE-HPLC es de un 73 %, que es idéntico en comparación con la muestra de alimentación. El ajuste del pH/filtración redujo la carga de HCP de la corriente de producto en un 60 % y redujo la carga de HCDNA en un 99,9 %.

30 La corriente de producto se cargó posteriormente en la columna de CEX que funcionaba en modo de unión y elución. El rendimiento de las etapas calculado (anticuerpo monomérico) fue de un 73 %. Para el producto, el "pico de monómero" detectado por SE-HPLC fue de un 86 %, que fue significativamente mayor en comparación con el de la muestra de alimentación (73 %). La CEX redujo la carga de HCP y HCDNA de la corriente de producto en un 88 % y un 98 %, respectivamente. La eliminación de agregados y fragmentos de anticuerpos, así como la drástica reducción de HCP y HCDNA, demuestran que la CEX elimina eficazmente las impurezas restantes en una carga de columna de 40 g/l.

## Ejemplo 2:

### 55 Procesamiento de proteína de una solución usando TFF de dos fases

El presente ejemplo se refiere al aislamiento y/o purificación de un anticuerpo de una solución que contiene el anticuerpo usando un procedimiento de purificación sin afinidad, en particular, AEX y CEX. La solución inicial es una corriente de alimentación de medios de cultivo celular acondicionado clarificado. Este ejemplo es idéntico al ejemplo

1, con la excepción de que la corriente de alimentación se precondicionó usando filtración de flujo tangencial de dos fases. En este experimento, la primera operación unitaria de TFF de la TFF de dos fases fue idéntica a la fase única de TFF usada en el ejemplo 1, es decir, se llevó a cabo con una membrana de ultrafiltración que tenía un valor de corte de 50 kD y fue seguida por un intercambio de tampón/diafiltración. Sin embargo, a diferencia del ejemplo 1, el presente estudio demuestra la adición de una segunda operación unitaria de TFF llevada a cabo con una columna que tenía un valor de corte de 300 kD, proporcionando TFF de dos fases. Esta configuración se puede ver en las figuras 1 o 2. El estudio ejemplificado añadió además una tercera operación unitaria de TFF/concentración posterior a la TFF de 300 kD, llevada a cabo con una columna que tenía un valor de corte de 50 kD. En la figura 3 se proporciona un esquema de la TFF de dos fases usada en este ejemplo. Las segunda y tercera operaciones unitarias de TFF (opcionalmente combinadas con diafiltración) se pueden combinar en paralelo como se muestra en el esquema de la figura 4. Siguiendo el procesamiento de TFF de dos fases (TFF 50 kD, TFF 300 kD, TFF 50 kD), se llevaron a cabo AEX y CEX como en el ejemplo 1 (con la excepción de una etapa de centrifugación/filtración como se explica a continuación). Este estudio se llevó a cabo con el anticuerpo anti-CSFR1 usado en el ejemplo 1.

**Procedimientos:**

***Filtración de flujo tangencial de dos fases y diafiltración (producto en retenido)***

La TFF de la primera etapa y la diafiltración se efectuaron como se describió para la TFF de una sola fase de la que se informó en el ejemplo 1. En la primera fase, se concentraron a 136 ml 945 ml de sobrenadante de cultivo celular clarificado que contenía el anticuerpo de interés en una concentración de 2,9 mg/ml.

Posteriormente, se llevó a cabo un intercambio de tampón mediante diafiltración frente a un volumen 10 veces mayor de Tris/HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5.

***Filtración de flujo tangencial de la segunda fase (producto en permeado)***

La TFF de la segunda fase se llevó a cabo de manera similar a la TFF de la primera fase, pero utilizando un Sartoc

Slice Cassette PESU 300 kD (área de filtración de 200 cm<sup>2</sup>, producto n.º 3081467902E-SG; Satorius Stedim). Durante esta segunda fase de la TFF, el producto (anticuerpo) pasa a través del filtro y se encuentra en el permeado (en consecuencia, el permeado de esta segunda fase de la TFF forma la corriente de producto). Durante esta segunda fase de la TFF, se diafiltraron 108 ml de muestra que contenía el anticuerpo a una concentración de 15,2 mg/ml (es decir, el retenido de la primera fase de la TFF) en la segunda columna contra un volumen de tampón de 15 veces (Tris 25 mM/HCl, NaCl 50 mM, pH 7,5).

***Concentración***

La TFF de la segunda fase se diseñó de manera que el producto está en el permeado y da como resultado un aumento drástico del volumen de la muestra que contiene el producto (es decir, un aumento drástico del volumen de la corriente de producto). En consecuencia, se usó una tercera TFF que usaba una columna con un valor de corte de 50 kD para concentrar el producto y reducir el volumen de la corriente de producto. Esta tercera fase de la TFF usó una columna con un valor de corte de 50 kD idéntico al de la TFF de la primera fase descrita anteriormente y en el ejemplo 1. En esta tercera fase, se concentraron 1627 ml de la corriente de producto a una concentración de 1,1 mg/ml (es decir, el permeado de la TFF de la segunda fase) en un volumen de 143 ml.

***Cromatografía de intercambio aniónico***

La AEX que siguió a la etapa de procesamiento de TFF de dos fases procedió como en el ejemplo 1. Las condiciones de cromatografía fueron las siguientes:

Material de intercambio:	Q-Sepharose FF (GE Healthcare, Friburgo, Alemania)
Columna:	Diámetro interno de 8 mm, longitud de 100 mm, volumen de 5,03 ml
Caudal:	150 cm/h (1,25 ml/min)
Solución de equilibrado:	Tris/HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5
Carga:	86 g de proteína/l de material de cromatografía
Solución de lavado:	Tris/HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5
Procedimiento de elución:	isocrático

La alimentación del producto se cargó en la columna de cromatografía como se indicó anteriormente. Después de cargar, la columna se lavó con solución de lavado y el anticuerpo se recuperó usando un procedimiento de elución

isocrática (modo de flujo continuo). Tenga en cuenta que, a diferencia del ejemplo 1, no se observó un aumento drástico en la contrapresión durante la AEX, y no fue necesaria una reducción del caudal.

**Ajuste de pH a 5,0**

Al igual que en el ejemplo 1, antes de la CEX, la muestra eluida de la columna de AEX se ajustó a un pH de 5,0 mediante la adición de ácido cítrico 1 M. Sin embargo, a diferencia del ejemplo 1, no se observó precipitación en esta fase y, por tanto, no fue necesaria la centrifugación/filtración de la corriente de producto. Más bien, la corriente de producto se cargó directamente en la columna de CEX.

**Cromatografía de intercambio catiónico: Modo de unión y elución**

Después del ajuste del pH, el anticuerpo se aisló de la corriente de producto usando CEX como se describió en el ejemplo 1. Las condiciones de cromatografía fueron las siguientes.

Material intercambio:	de	Poros 50HS (Life Technologies Co., Carlsbad, CA, EE. UU.)
Columna:		Diámetro interno de 8 mm, longitud de 100 mm, volumen de 5,03 ml
Caudal:		150 cm/h (= 1,25 ml/min)
Solución equilibrado:	de	Citrato de sodio 10 mM, pH 5,0
Carga:		20 g de proteína/l de material de cromatografía
Solución de lavado:		Citrato de sodio 10 mM, pH 5,0
Solución de elución:		Citrato de sodio 10 mM, NaCl 750 mM, pH 5,0
Procedimiento elución:	de	gradiente lineal de un 0 % (v/v) a un 100 % (v/v) de solución de elución en 22,5 volúmenes de columna

Después de cargar la columna CEX como se indicó anteriormente, la columna se lavó con solución de lavado. El anticuerpo en forma monomérica se recuperó con un procedimiento de elución en gradiente lineal, por lo que el valor del pH se mantuvo constante y la conductividad se varió (aumentó) mediante la adición de cloruro de sodio.

**Determinación de anticuerpo y contaminantes**

La concentración de anticuerpo y la concentración de los contaminantes, proteínas de célula huésped ("HCP") y ADN de célula huésped ("HCDNA"), se determinaron en varias fases del experimento de acuerdo con los procedimientos descritos en el ejemplo 1.

**Resultados**

La concentración de anticuerpo, la proporción de monómero de anticuerpo y los niveles de contaminantes para la corriente de alimentación inicial, las corrientes de producto intermedias y el eluido final se proporcionan en la tabla 2. El rendimiento de las etapas proporciona el porcentaje de anticuerpo retenido para esa operación unitaria particular.

Tabla 2

Muestra	Concentración de anticuerpo [mg/ml]	Rendimiento de las etapas (anticuerpo monomérico) [%]	Monómero SE-HPLC [%]	Nivel de HCP [ng/mg]	Nivel de HCDNA [pg/mg]
Sobrenadante de cultivo celular clarificado (fresco)	2,90	100	n.d.	245635	6982759
Valor de corte de 50 kD de TFF (retenido)	15,23	77	68,80	176162	5300722
Valor de corte de 300 kD de TFF (permeado)	1,13	100 (>100)	71,96	138600	330088

Muestra	Concentración de anticuerpo [mg/ml]	Rendimiento de las etapas (anticuerpo monomérico) [%]	Monómero SE-HPLC [%]	Nivel de HCP [ng/mg]	Nivel de HCDNA [pg/mg]
Valor de corte de 50 kD de TFF (retenido)	12,0	93	72,44	132169	588750
Mezcla de elución de AEX, pH 7,5	8,6	92	75,25	19853	61012
Mezcla de elución de AEX con ajuste de pH (pH 7,5 a 5,0), pH 5,0	n.d.	n.d.	n.d.	16478	37558
Mezcla de elución de CEX	6,18	90	95,86	1449	223
<b>Rendimiento global</b>		<b>59 %</b>			
n.d. (no determinado)					

Como se informó anteriormente, la corriente de alimentación inicial fue de 945 ml de sobrenadante de cultivo celular clarificado que tenía una concentración de anticuerpo de 2,9 g/l. La carga de HCP fue de 245 635 ng/mg, la carga de HCDNA fue de 6 982 759 pg/mg.

5 Después de la TFF de la primera fase con un valor de corte de 50 kD e intercambio de tampón/diafiltración, el rendimiento de las etapas calculado para el anticuerpo monomérico fue de aproximadamente un 77 %. El "pico de monómero" de la corriente de producto (retenido) detectado por SE-HPLC fue de un 69 %. La TFF de una sola fase redujo la carga de HCP en la corriente de producto en un 28 % y la carga de HCDNA, en un 24 %. Esta es la operación unitaria idéntica a la TFF de una sola fase de la que se informa en el ejemplo 1.

Después de la TFF de la segunda fase con un valor de corte de 300 kD, el rendimiento de las etapas calculado para el anticuerpo monomérico fue de un 112 %. El "pico de monómero" detectado por SE-HPLC fue de un 72 %, que es ligeramente superior al de la alimentación aplicada (69 %). La TFF de la segunda fase redujo la carga de HCP y la carga de HCDNA de la corriente de producto en un 22 % y un 94 %, respectivamente.

Para la siguiente etapa de TFF/concentración usando una columna con un valor de corte de 50 kD, el rendimiento de las etapas calculado (anticuerpo monomérico) fue de un 93 %. Para la muestra eluida, el "pico de monómero" detectado por SE-HPLC fue de un 72 %, que fue idéntico a la muestra de alimentación aplicada. La fase de TFF/concentración redujo la carga de HCP de la corriente de producto en un 5 %, mientras que la carga de HCDNA aumentó en un 78 % (lo que se atribuye a la variación del ensayo).

La AEX posterior al preacondicionamiento de la TFF de dos fases se hizo funcionar en modo de flujo continuo. La carga de la columna fue de 86 g/l. El rendimiento de las etapas calculado para la AEX (anticuerpo monomérico) fue de un 92 %. El "pico de monómero" detectado por SE-HPLC fue de un 75 %, ligeramente más alto en comparación con la muestra de alimentación (72 %). La operación unitaria de AEX redujo la carga de HCP de la corriente de producto en un 85 %, mientras que la carga de HCDNA se redujo en un 89%. A diferencia de la AEX que usa un preacondicionamiento de TFF de una sola fase como en el ejemplo 1, los datos de HCP y HCDNA indican que la AEX posterior al preacondicionamiento de TFF de dos fases contribuyó significativamente al proceso de purificación, aunque se hace funcionar en modo de flujo continuo en una carga de columna comparativamente alta.

Antes de la etapa de CEX, el pH de la corriente de producto se ajustó a 5,0. A diferencia de la TFF de una sola fase del ejemplo 1, no se observó precipitación en la muestra en esta fase y la corriente de muestra/producto se cargó directamente en la columna de CEX.

La columna de CEX se hizo funcionar en modo de unión y elución. El rendimiento de las etapas calculado (anticuerpo monomérico) fue de un 90 %. Para el producto, el "pico de monómero" detectado por SE-HPLC fue de un 96 %, que fue mucho mayor en comparación con el de la muestra de alimentación (72 %). La CEX redujo la carga de HCP y HCDNA de la corriente de producto en un 73% y un 99%, respectivamente. La eliminación de agregados y fragmentos de anticuerpos, así como la drástica reducción de HCP y HCDNA, demuestran que la CEX elimina eficazmente las impurezas restantes en una carga de columna de 20 g/l.

### Ejemplo 3:



**Procesamiento de proteína de una solución usando TFF de una sola fase**

El ejemplo 1 se repitió usando una corriente de alimentación que contenía una proteína de interés diferente, en particular, un anticuerpo anti-angiopoyetina 2 (Ang2)/VEGF (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. 2010/0111967). En el presente documento solo se informa de las desviaciones respecto a los procedimientos del ejemplo 1.

**Procedimientos:****Filtración de flujo tangencial única y diafiltración (producto en retenido)**

En la TFF de una sola fase, se concentraron a 134 ml 950 ml de sobrenadante de cultivo celular clarificado que contenía el anticuerpo anti-Ang2/VEGF en una concentración de 2,7 mg/ml. El intercambio de tampón también se realizó posteriormente de manera idéntica al ejemplo 1.

**Cromatografía de intercambio aniónico**

La AEX procedió de acuerdo con el ejemplo 1, con la excepción de que la carga de la columna fue de 19 g de proteína/l de material de columna. A diferencia del proceso de AEX del que se informa en el ejemplo 1, no se observó un aumento de la contrapresión en esta fase del procesamiento del anticuerpo anti-Ang2/VEGF; el caudal de 150 cm/h se mantuvo durante toda la operación unitaria. Esto se debe probablemente a la concentración drásticamente menor de HCDNA en la corriente de alimentación del anticuerpo anti-Ang2/VEGF inicial en comparación con la corriente de alimentación de anti-CSFR1 inicial en el ejemplo 1 (aproximadamente un 80 % menos; compárense las tablas 1 y 3). Esto da como resultado una concentración más baja de HCDNA para todas las operaciones unitarias antes de la precipitación y filtración.

**Ajuste de pH a 5,0**

A pesar de la menor concentración de HCDNA en todo el presente proceso en comparación con la del ejemplo 1, también se observó precipitación para la corriente de producto anti-Ang2/VEGF durante el ajuste del pH a 5,0. Nuevamente, se supuso que solo los contaminantes precipitaron cuando la concentración de anticuerpo en la corriente de producto no se alteró. Como en el ejemplo 1, la muestra se clarificó por centrifugación y filtración antes de la CEX.

**Cromatografía de intercambio catiónico: Modo de unión y elución**

La CEX de la muestra anti-Ang2/VEGF se realizó como en el ejemplo 1, con la excepción de disminuir la carga de la columna a 13 g de proteína/l de material de cromatografía.

**Determinación de anticuerpo y contaminantes**

La concentración de anticuerpos y la concentración de los contaminantes HCP y HCDNA se determinaron a lo largo del experimento como se describió en el ejemplo 1.

**Resultados**

La concentración de anticuerpo, la proporción de monómero de anticuerpo y los niveles de contaminantes para la corriente de alimentación, las corrientes de producto intermedias y el eluido final se proporcionan en la tabla 3.

Tabla 3

Muestra	Concentración de anticuerpo [mg/ml]	Rendimiento de las etapas (anticuerpo monomérico) [%]	Monómero SE-HPLC [%]	Nivel de HCP [ng/mg]	Nivel de HCDNA [pg/mg]
Sobrenadante de cultivo celular clarificado (fresco)	2,66	100	n.d.	420531	14443609
Valor de corte de 50 kD de TFF (retenido)	11,9	86	65,38	444247	1194958
Mezcla de elución de AEX, pH 7,5	6,3	79	78,34	167790	1225397

Muestra	Concentración de anticuerpo [mg/ml]	Rendimiento de las etapas (anticuerpo monomérico) [%]	Monómero SE-HPLC [%]	Nivel de HCP [ng/mg]	Nivel de HCDNA [pg/mg]
Mezcla de elución de AEX con ajuste de pH (pH 7,5 a 5,0), pH 5,0	6,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mezcla de elución de CEX	3,14	99	93,69	16308	65
<b>Rendimiento global</b>		<b>67 %</b>			
n.d. (no determinado)					

Como se informó anteriormente, la corriente de alimentación inicial fue de 950 ml de sobrenadante de cultivo celular clarificado que tenía una concentración de anticuerpo de 2,7 g/l. La carga de HCP fue de 420 531 ng/mg, la carga de HCDNA fue de 1 443 609 pg/mg.

Después de la TFF de una sola fase con un valor de corte de 50 kD e intercambio de tampón/diafiltración, el rendimiento de las etapas calculado para el anticuerpo monomérico fue de aproximadamente un 86 %. El "pico de monómero" del retenido detectado por SE-HPLC fue de un 65 %. La TFF de una sola fase aumentó la carga de HCP en la corriente de producto en un 6 % y la carga de HCDNA, en un 17 %.

La AEX posterior a TFF/diafiltración se hizo funcionar en modo de flujo continuo. La carga de la columna fue de 79 g/l. El rendimiento de las etapas calculado para la AEX (anticuerpo monomérico) fue de un 79 %. El "pico de monómero" detectado por SE-HPLC fue de un 78 %, ligeramente más alto en comparación con la muestra de alimentación (65 %). La operación unitaria de intercambio de tampón/AEX redujo la carga de HCP de la corriente de producto en un 62 %, mientras que la carga de HCDNA se incrementó ligeramente en un 3 %. Aunque la eliminación de HCP se logró en cierta medida, los datos actuales confirman los resultados del ejemplo 1, es decir, que la etapa de AEX subsiguiente a una fase única del procesamiento de TFF no contribuye significativamente al proceso de purificación del anticuerpo. De nuevo, en consonancia con el ejemplo 1, se cree que el procesamiento de AEX no contribuyó significativamente a una reducción de la concentración de HCDNA debido a la sobrecarga de la columna. La prevención de la sobrecarga puede remediarse quizá mediante el uso de una columna significativamente mayor y más costosa.

Antes de la etapa de CEX, el pH de la muestra se ajustó a 5,0. Se observó nuevamente precipitación en la presente corriente de producto, a pesar de que la muestra tenía una concentración significativamente reducida de HCP y HCDNA en comparación con la muestra correspondiente del ejemplo 1. De nuevo, se supuso que solo las impurezas precipitaban porque la concentración de anticuerpo de la muestra no cambió con respecto al valor antes del ajuste del pH. Los precipitados se eliminaron por filtración. No se realizó un análisis de monómeros de anticuerpos ni de contaminantes después del ajuste de pH/precipitación/filtración de la muestra.

La muestra se cargó posteriormente en la columna de CEX que funcionaba en modo de unión y elución. El rendimiento de las etapas calculado (anticuerpo monomérico) fue de un 99 %. Para el producto, el "pico de monómero" detectado por SE-HPLC fue de un 94 %. Debido a que la corriente de producto intermedia no se sometió a prueba para determinar la concentración de contaminantes como se informó anteriormente, no se pudo evaluar la contribución de la etapa de CEX a la reducción de contaminantes. Sin embargo, la carga final de HCP fue de 16 308 ng/mg y la carga final de HCDNA fue de 65 pg/ml.

#### **Ejemplo 4:**

##### **Procesamiento de proteína de una solución usando TFF de dos fases**

El presente ejemplo repite el ejemplo 2 utilizando la corriente de alimentación del ejemplo 3, es decir, que contiene un anticuerpo anti-Ang2/VEGF. Los procedimientos del ejemplo 2 no se detallan nuevamente y solo son desviaciones de los procedimientos de los que se informa en el presente documento.

##### **Procedimientos:**

##### ***Filtración de flujo tangencial de dos fases y diafiltración (producto en retenido)***

En la TFF de la primera fase, se concentraron a 134 ml 950 ml de sobrenadante de cultivo celular clarificado que contenía el anticuerpo de interés en una concentración de 2,7 mg/ml. El intercambio de tampón procedió como en el ejemplo 2.

**Filtración de flujo tangencial de la segunda fase (producto en permeado)**

5 En la TFF de la segunda fase, se diafiltraron 98 ml de muestra de la corriente de producto que contenía el anticuerpo a una concentración de 11,9 mg/ml (es decir, el retenido de la TFF de la primera fase) frente a un volumen de tampón de 18 veces.

**Concentración**

10 En la TFF/concentración de la tercera fase, se concentraron 1524 ml de la corriente de producto que contenía 1,0 mg/ml de anticuerpo en un volumen de 157 ml.

**Cromatografía de intercambio aniónico**

15 La AEX procedió de acuerdo con los procedimientos del ejemplo 2, con la excepción de que la carga fue de 80 g de proteína/l de material de cromatografía.

**Ajuste de pH a 5,0**

20 El ajuste del pH se realizó como se detalló en el ejemplo 2.

**Cromatografía de intercambio catiónico: Modo de unión y elución**

25 La CEX se realizó como se detalló en el ejemplo 2.

**Determinación de anticuerpo y contaminantes**

30 La concentración de anticuerpo y la concentración de los contaminantes, proteínas de célula huésped ("HCP") y ADN de célula huésped ("HCDNA"), se determinaron durante todo el experimento de acuerdo con los procedimientos descritos en el ejemplo 1.

**Resultados**

35 La concentración de anticuerpo, la proporción de monómero de anticuerpo y los niveles de contaminantes para la corriente de alimentación inicial, las corrientes de producto intermedias y el eluido final se proporcionan en la tabla 4.

Tabla 4

Muestra	Concentración de anticuerpo [mg/ml]	Rendimiento de las etapas (anticuerpo monomérico) [%]	Monómero SE-HPLC [%]	Nivel de HCP [ng/mg]	Nivel de HCDNA [pg/mg]
Sobrenadante de cultivo celular clarificado (fresco)	2,66	100	n.d.	420531	1443609
Valor de corte de 50 kD de TFF (retenido)	11,9	86	65,38	444247	1194958
Valor de corte de 300 kD de TFF (permeado)	1,0	100	75,08	315945	170000
Valor de corte de 50 kD de TFF (retenido)	7,2	75	76,02	347662	165000
Mezcla de elución de AEX, pH 7,5	3,6	90	80,07	124815	17139
Mezcla de elución de AEX con ajuste de pH (pH 7,5 a 5,0), pH 5,0	3,6	100	n.d.	n.d.	n.d.

Muestra	Concentración de anticuerpo [mg/ml]	Rendimiento de las etapas (anticuerpo monomérico) [%]	Monómero SE-HPLC [%]	Nivel de HCP [ng/mg]	Nivel de HCDNA [pg/mg]
Mezcla de elución de CEX	6,02	100	94,80	8878	29
<b>Rendimiento global</b>		<b>58 %</b>			
n.d. (no determinado)					

Como se informó anteriormente, la corriente de alimentación inicial fue de 950 ml de sobrenadante de cultivo celular clarificado que tenía una concentración de anticuerpo de 2,7 g/l. La carga de HCP fue de 420 531 ng/mg, la carga de HCDNA fue de 1 443 609 pg/mg.

Después de la TFF de la primera fase con un valor de corte de 50 kD e intercambio de tampón/diafiltración, el rendimiento de las etapas calculado para el anticuerpo monomérico fue de aproximadamente un 86 %. El "pico de monómero" del retenido detectado por SE-HPLC fue de un 65 %. La TFF de una sola fase aumentó ligeramente la carga de HCP en la corriente de producto en un 6 % y la carga de HCDNA se redujo en un 17 %. Esta es la operación unitaria idéntica a la TFF de una sola fase de la que se informa en el ejemplo 3.

Después de la TFF de la segunda fase con un valor de corte de 300 kD, el rendimiento de las etapas calculado para el anticuerpo monomérico fue de un 100 %. El "pico de monómero" detectado por SE-HPLC fue de un 75 %, que es significativamente superior al de la alimentación aplicada (65 %). La TFF de la segunda fase redujo la carga de HCP y la carga de HCDNA de la corriente de producto en un 29 % y un 86 %, respectivamente.

Para la siguiente etapa de TFF/concentración usando una columna con un valor de corte de 50 kD, el rendimiento de las etapas calculado (anticuerpo monomérico) fue de un 100 %. Para la muestra eluida, el "pico de monómero" detectado por SE-HPLC fue de un 76 %, que era ligeramente más alto que el de la muestra de alimentación aplicada. La fase de TFF/concentración incrementó la carga de HCP de la corriente de producto en un 10 %, mientras que la carga de HCDNA se redujo en un 3 %.

La AEX posterior al precondicionamiento de la TFF de dos fases se hizo funcionar en modo de flujo continuo. El rendimiento de las etapas calculado para la AEX (anticuerpo monomérico) fue de un 90 %. El "pico de monómero" detectado por SE-HPLC fue de un 80 %, ligeramente más alto en comparación con la muestra de alimentación (76 %). La operación unitaria de AEX redujo la carga de HCP de la corriente de producto en un 64 %, mientras que la carga de HCDNA se redujo en un 87 %. A diferencia de la AEX que usa un procesamiento de TFF de una sola fase como en el ejemplo 3 (y el ejemplo 1), los datos de HCP y HCDNA confirman los resultados del ejemplo 2, a saber, que la AEX posterior al procesamiento de TFF de dos fases contribuye significativamente al proceso de purificación, aunque se hace funcionar en modo de flujo continuo en una carga de columna comparativamente alta.

Antes de la etapa de CEX, el pH de la corriente de producto se ajustó a 5,0. Nuevamente, a diferencia del procesamiento de TFF de una sola fase del que se informa en los ejemplos 1 y 3, y en consonancia con el procesamiento de TFF de dos fases del que se informa en el ejemplo 2, no se observó precipitación en la corriente de producto en esta fase, y la muestra se cargó directamente en la columna de CEX.

La columna de CEX se hizo funcionar en modo de unión y elución. El rendimiento de las etapas calculado (anticuerpo monomérico) fue de un 100 %. Para el producto, el "pico de monómero" detectado por SE-HPLC fue de un 95 %, que fue mucho mayor en comparación con el de la muestra de alimentación (80 %). La CEX redujo la carga de HCP y HCDNA de la muestra de alimentación en un 93 % y un 99,8 %, respectivamente. La eliminación de agregados y fragmentos de anticuerpos, así como la drástica reducción de HCP y HCDNA, demuestran que la CEX elimina eficazmente las impurezas restantes en una carga de columna de 20 g/l (en consonancia con el ejemplo 2).

#### Conclusiones generales en vista de los resultados de los ejemplos 1 a 4

El uso de un procedimiento de TFF de una sola fase de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica no logró reducir satisfactoriamente los niveles de contaminantes (por ejemplo, HCP y HCDNA), lo que dio como resultado la sobrecarga del proceso cromatográfico corriente abajo, por ejemplo, AEX. Sin embargo, empleando un procedimiento de TFF de dos fases de acuerdo con la presente invención, se evitó sobrecargar la columna de AEX en un tamaño de columna dado. Esto indica que los procedimientos de TFF de dos fases permiten la reducción eficaz de contaminantes, por ejemplo, la eliminación de HCDNA y/o HCP, para la misma corriente de alimentación inicial utilizando columnas cromatográficas significativamente más pequeñas que las implementadas actualmente. Esto supone una ventaja económica significativa asociada con el procedimiento de TFF de dos fases divulgado en el presente documento.

5 El estado de la técnica demuestra el interés en el uso de purificación no basada en afinidad, por ejemplo, AEX y CEX. Sin embargo, estos procedimientos han sido insatisfactorios y actualmente no se consideran un reemplazo significativo para los sistemas basados en afinidad. En particular, la implementación de procesos cromatográficos sin afinidad a menudo se asocia con efectos no deseados, tales como la formación de precipitados en la corriente de producto. Por ejemplo, el procesamiento de la corriente de producto corriente abajo de una TFF de una sola fase para ajustar el pH de 7,5 a 5,0 antes de la CEX dio como resultado la precipitación de impurezas. El procesamiento de la corriente de producto para eliminar el precipitado requiere mucho tiempo y, por lo demás, se asocia con un coste significativo como se detalla en el presente documento. Sin embargo, la implementación de los procedimientos de TFF de dos fases de 10 la invención eliminó la formación de precipitados durante esta etapa de procesamiento, aumentando los rendimientos y ahorrando en los costes asociados con el procesamiento de precipitados.

15 La comparación directa de la TFF de una sola fase y la TFF de dos fases de la invención reveló que esta última es superior en lo que respecta a la calidad del producto en lo que respecta al nivel de producto monomérico, nivel de HCP y nivel de HCDNA.

**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Un procedimiento para separar una proteína de interés de una solución de cultivo celular que contiene dicha proteína usando ultrafiltración de flujo tangencial (TFF) de dos fases, en el que dicha TFF de dos fases comprende una primera operación unitaria de TFF y una segunda operación unitaria de TFF, en el que
- 10        dicha primera operación unitaria de TFF filtra una primera corriente de producto que contiene dicha proteína usando una primera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte tal que dicha proteína se recupera en el retenido de la primera operación unitaria de TFF; y
- 15        dicha segunda operación unitaria de TFF filtra una segunda corriente de producto que contiene dicha proteína usando una segunda membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte tal que dicha proteína se recupera en el permeado de la segunda operación unitaria de TFF;
- 15 y en el que dicha primera o dicha segunda corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular.
- 20 **2.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha primera corriente de producto es un sobrenadante de cultivo celular y dicha primera operación unitaria de TFF está corriente arriba de dicha segunda operación unitaria de TFF.
- 25 **3.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicha TFF de dos fases comprende además una tercera operación unitaria de TFF que filtra una tercera corriente de producto que contiene dicha proteína usando una tercera membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte tal que dicha proteína está en el retenido de la tercera operación unitaria de TFF, y en el que dicha tercera operación unitaria de TFF está corriente abajo de dichas primera y segunda operaciones unitarias de TFF.
- 30 **4.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el valor de corte de la tercera membrana de ultrafiltración es el mismo que el valor de corte de la primera membrana de ultrafiltración.
- 35 **5.** El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha proteína tiene un peso molecular de al menos 10 kD pero no mayor de 500 kD.
- 40 **6.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5,
- 40        en el que dicha primera membrana de ultrafiltración tiene un valor de corte de la mitad (0,5 veces) del peso molecular de dicha proteína o menos; y
- 40        en el que dicha segunda membrana de ultrafiltración tiene un valor de corte de al menos dos veces (2 veces) el peso molecular de dicha proteína pero no mayor de 1000 kD.
- 45 **7.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que dicha proteína tiene un peso molecular de  $150 \pm 75$  kD.
- 45 **8.** El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha proteína es un anticuerpo.
- 50 **9.** El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que dicha primera membrana de ultrafiltración tiene un valor de corte de 50 kD o menos; y en el que dicha segunda membrana de ultrafiltración tiene un valor de corte de entre 300 kD y 1000 kD.
- 55 **10.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha primera membrana de ultrafiltración tiene un valor de corte de 50 kD o menos; y en el que dicha segunda membrana de ultrafiltración tiene un valor de corte de entre 300 kD.
- 60 **11.** El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha TFF de dos fases reduce la concentración de proteína de célula huésped (HCP) en la solución que contenía la proteína de interés en al menos un 10 % con respecto a dicho sobrenadante de cultivo celular y/o reduce la concentración de ADN de célula huésped (HCDNA) en la solución que contiene la proteína de interés en al menos un 30 % con respecto a dicho sobrenadante de cultivo celular.
- 65 **12.** El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicha TFF de dos fases reduce la concentración de HCP en la solución que contiene la proteína de interés a 400 000 ng por mg de dicha proteína o menos y/o reduce la concentración de HCDNA en la solución que contiene la proteína de interés a 1 500 000 pg por mg de dicha proteína o menos.

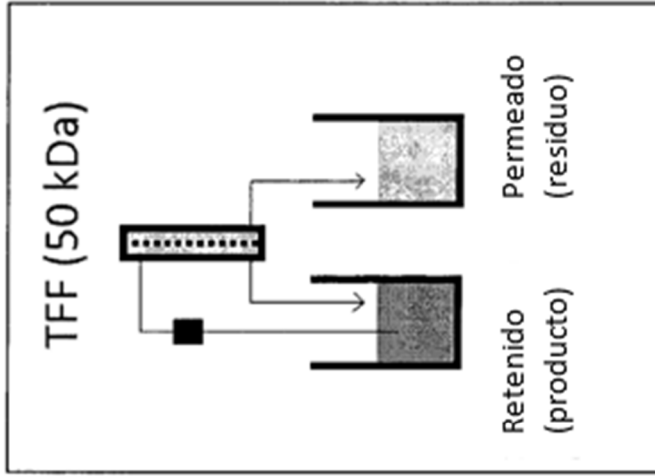
**13.** El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un proceso de cromatografía en columna corriente abajo de dicha TFF de dos fases.

5 **14.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho proceso de cromatografía en columna es un proceso de cromatografía en columna sin afinidad.

10 **15.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en el que dicho proceso de cromatografía en columna es una operación unitaria de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) o una operación unitaria de cromatografía de intercambio catiónico (CEX).

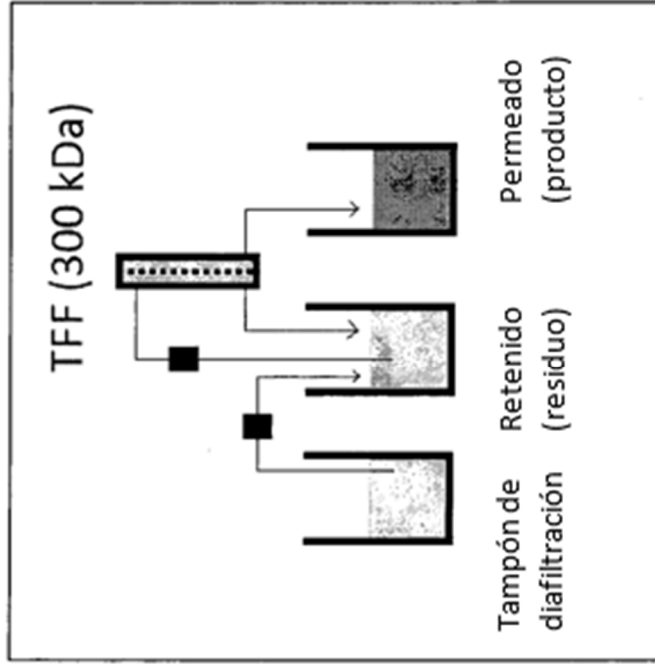
**Etapa 1:**

concentración a través de 50 kD (producto en retenido)



**Etapa 2:**

diafiltración a través de 300 kD (producto en permeado)

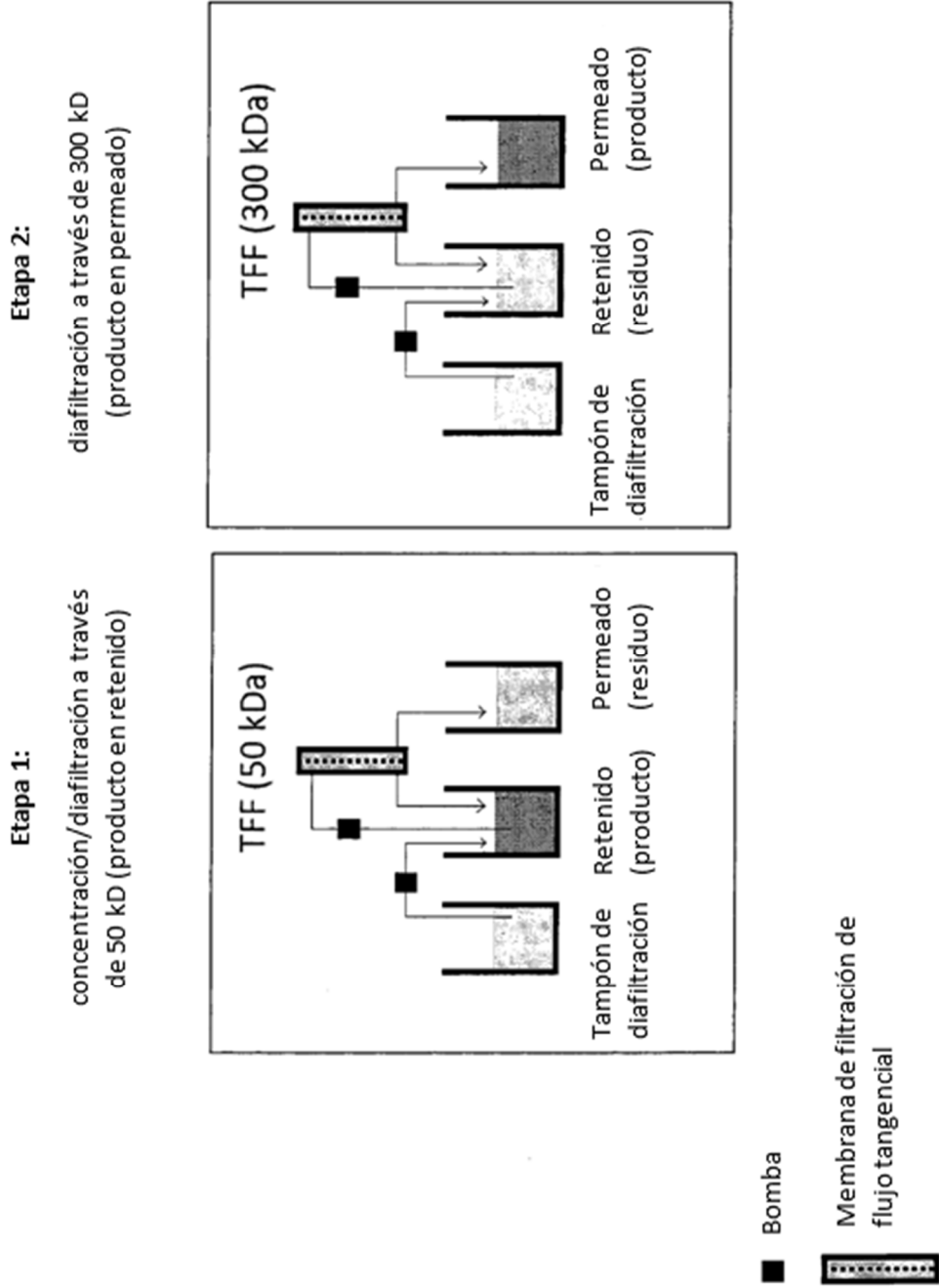


■ Bomba

▤ Membrana de filtración de flujo tangencial

**Figura 1**





**Figura 2**

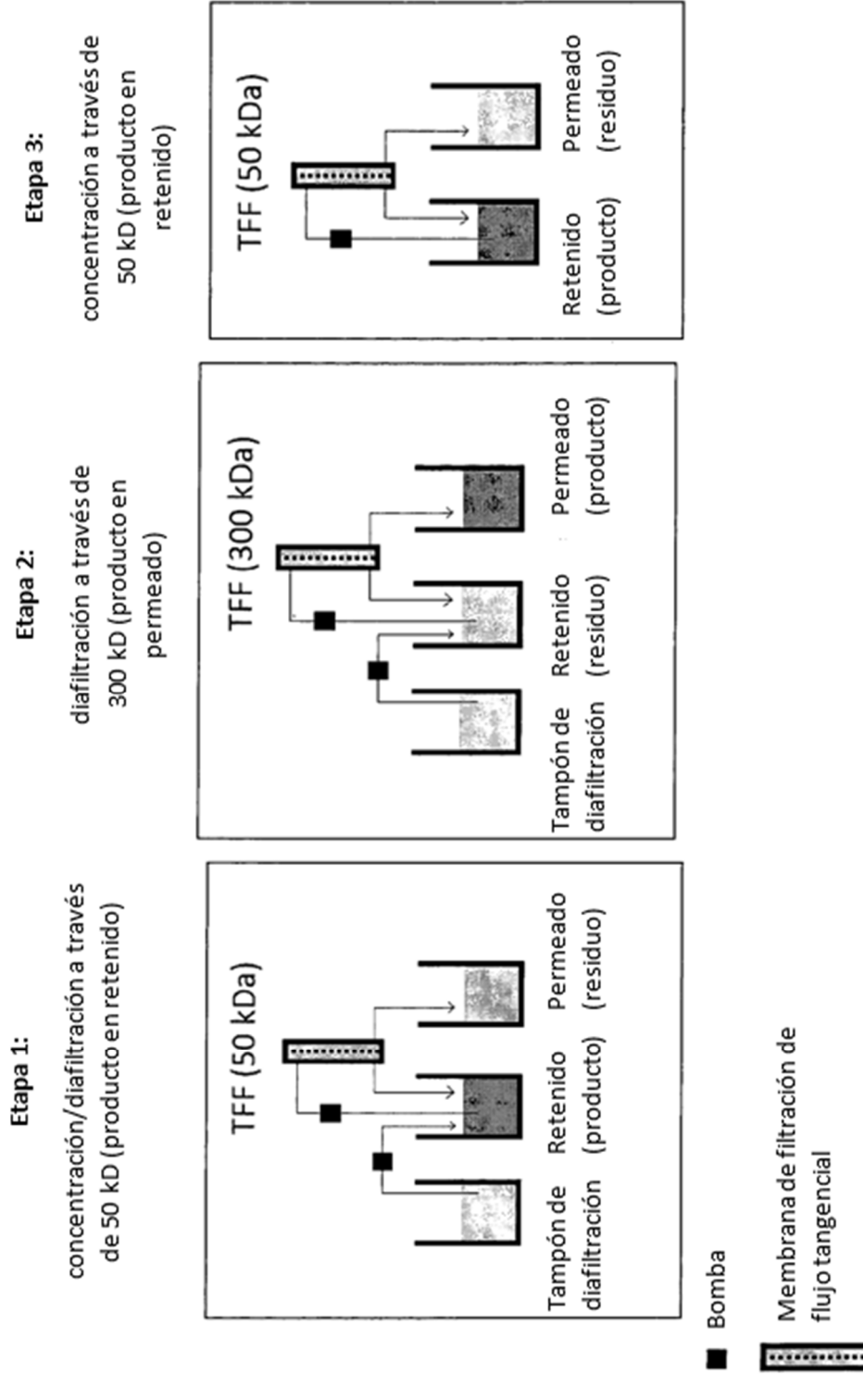
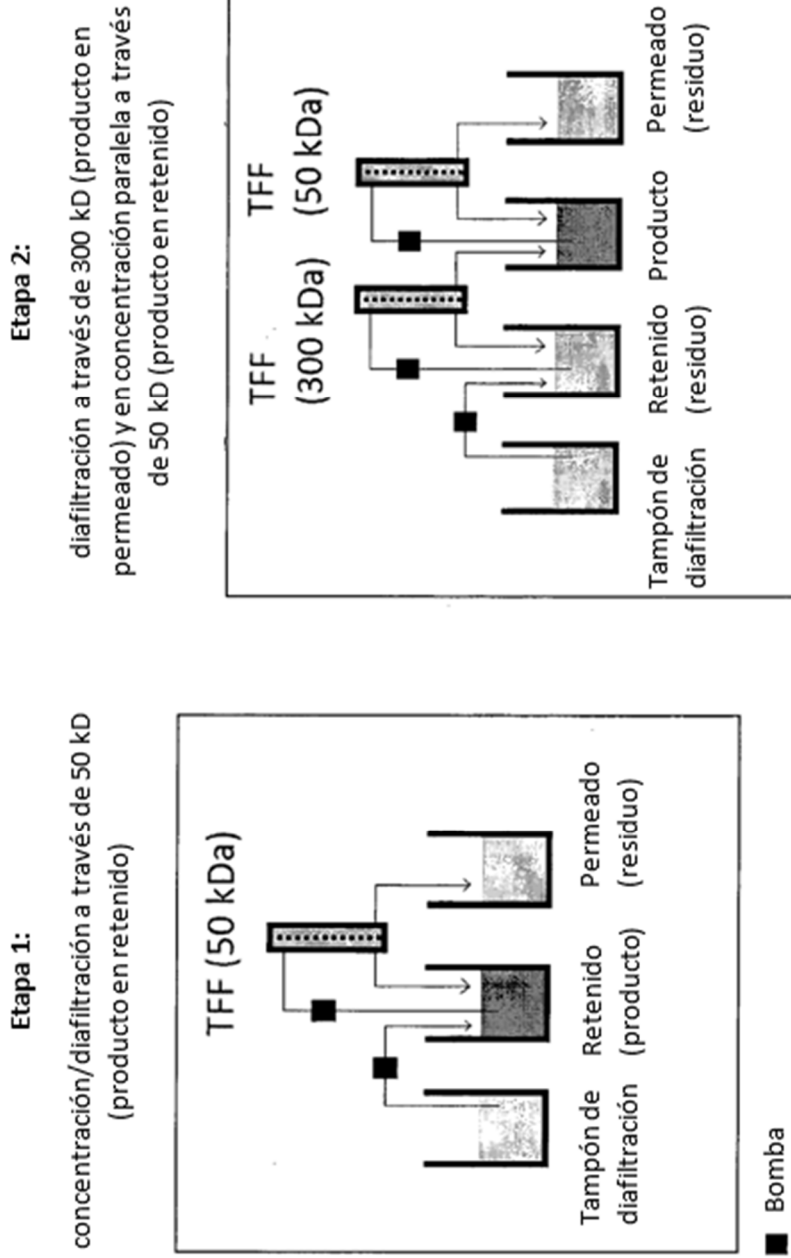


Figura 3



**Figura 4**