

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 278**

51 Int. Cl.:

C12N 5/04 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2013 PCT/EP2013/065264**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14013045**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2013 E 13739224 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2875123**

54 Título: **Filtración de sobrenadantes de cultivos celulares**

30 Prioridad:

20.07.2012 EP 12177277

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

20.06.2019

73 Titular/es:

GREENOVATION BIOTECH GMBH (100.0%)

Hans-Bunte-Strasse 19

79108 Freiburg, DE

72 Inventor/es:

GROSSE, THOMAS;

NIEDERKRÜGER, HOLGER, DR. y

SCHAAF, ANDREAS

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 717 278 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

Filtración de sobrenadantes de cultivos celulares.

5 La presente invención se refiere a procedimientos para la filtración de sobrenadantes de cultivos celulares.

El uso de procedimientos biotecnológicos para fines de producción representa una oportunidad importante para producir sustancias que no pueden producirse o no pueden producirse económicamente por otros medios, por ejemplo por síntesis química, y no están disponibles en cantidades suficientes como materias primas en la naturaleza. La producción de sustancias vegetales se concentra actualmente en metabolitos secundarios, aumentando constantemente la proporción de productos de expresión recombinantes. La producción a gran escala se concentra sobre todo en cultivos de células vegetales o plantas. Mediante la posibilidad de transferir ADN a las plantas se han posibilitado cambios no solo cuantitativos y cualitativos en los componentes de la planta. Además, los cultivos de plantas y células celulares se han convertido en una cuestión de interés para la producción de proteínas heterólogas (Fischer et al., Current Opinion in Plant Biology 2004, 7: 1-7).

Un enfoque implica la producción de proteínas heterólogas en plantas completas transgénicas. Una desventaja fundamental del uso de plantas completas, tales como las descritas anteriormente a modo de ejemplo, se encuentra en la necesidad de su cultivo que requiere mucho tiempo y costes elevados, así como en la gran superficie requerida para el cultivo a escala industrial. Además, la purificación de las sustancias objetivo deseadas a partir de plantas completas generalmente requiere etapas de procedimiento complejas, en particular cuando se imponen altas exigencias a las características y la calidad de los productos, como es el caso de las sustancias empleadas farmacéuticamente o nutricionalmente.

En el segundo enfoque, se utilizaron cultivos de células de plantas transgénicas para la producción de anticuerpos. Por ejemplo, la expresión de anticuerpos u otras proteínas de mamíferos (Huether *et al.*, Plant Biol. 2005, 7: 292-299) y su secreción en el medio. Dado que la purificación de proteínas heterólogas a partir de células requiere un gran esfuerzo, la secreción de la proteína diana en el medio representa una mejora significativa. Además, los aspectos de seguridad también favorecen la producción de proteínas recombinantes farmacéuticamente relevantes en cultivos celulares, dado que las células de plantas transgénicas se pueden cultivar exclusivamente en biorreactores y no es necesario que se liberen. El desarrollo de biorreactores para cultivos de células vegetales heterótrofas a gran escala posibilitó el cultivo a gran escala necesario.

Para una purificación adicional del producto, la biomasa debe separarse del sobrenadante en una primera etapa. Para ello, se conocen varios procesos de filtración. En el caso de proteínas secretadas recombinantes, el producto está presente en el sobrenadante del cultivo. Por lo tanto, el objetivo es retener la menor cantidad remanente posible de humedad residual/sobrenadante en la fracción de biomasa separada para evitar pérdidas de producto. Se conocen diversos procedimientos de filtración a escala de laboratorio. Buettner-Mainik Annette et al. (Plant Biotechnology Journal 9 (3) (2011): 373-383) describen la producción de factor H humano en *P. patens*. El cultivo celular acuoso se separa a través de un tejido a través de un filtro de succión al vacío. El producto obtenido estaba húmedo y tuvo que secarse. Lucumi et al. (Process Biochemistry 41 (10) (2006): 2180-2187, describen una filtración de flujo cruzado durante la producción de rhVGEF en un biorreactor *P. patens*. Marta Fernández Núñez (E-Disertación de la Universidad de Hamburgo (2010), p. 48, capítulo 2.11.1 describe una filtración al vacío en perfiles de citoquinina en *P. patens*. Fischer Rainer et al. (Journal of Immunological Methods 226 (1-3) (1999): 1-10), se refiere a una filtración al vacío de cultivos de callos de tabaco que estaban húmedos después de la filtración. El documento WO 2005/108596 A1 se refiere a la síntesis *in vitro* de péptidos cíclicos con un nudo de cisteína mediante expresión en células vegetales. Se separaron suspensiones celulares con un filtro de succión al vacío. Kim Sun Tae *et al.* (Proteomics 9 (5) (2009): 1302-1313) describen un cocultivo de células de arroz con el hongo *M. grisea* en suspensión. La separación de proteínas secretadas se llevó a cabo mediante filtración al vacío. Ndimba Bongani K. (Proteomics 3 (6) (2003): 1047-1059) aborda una investigación sobre cambios en la matriz extracelular de *Arabidopsis* en cultivos en suspensión. Para examinar el sobrenadante del cultivo, se utilizó una filtración al vacío.

Un problema particular consiste en que en plantas y cultivos de células vegetales, a diferencia de los procesos con células animales y bacterias, el residuo sólido, por ejemplo la torta de filtración en el caso de filtración, ocupa un inmenso volumen. Como resultado, grandes cantidades del sobrenadante se unen y retienen. Un objeto de la presente invención es, por lo tanto, una separación mejorada de la biomasa sólida y el sobrenadante del cultivo.

La presente invención se refiere a un procedimiento para separar un sobrenadante líquido de células con una pared celular que comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar una mezcla de las células con un líquido,
- b) llenar una caja de filtro con la mezcla, en la que un primer filtro con un tamaño de poro de entre 4 μm a 50 μm está previsto sobre una superficie en la caja de filtro inferior plana y estando conectadas las paredes de la caja de filtro de manera sellada a la superficie de base perforada plana con forma de tamiz,

c) aplicar una presión diferencial de por lo menos 0,5 bares (500 hPa) a la mezcla por medio de aire comprimido, con lo que la porción líquida de la mezcla es presionada a través del filtro y una torta de filtro que contiene células permanece en la caja de filtro, siendo la presión absoluta en el punto de extracción de por lo menos 0,7 bares,

d) extraer el líquido filtrado.

Básicamente, una filtración con el filtro según la invención también discurriría exitosamente sin utilizar un filtro de fondo plano (por ejemplo, con un filtro de bolsa) y también sin presión, es decir, una filtración puramente por gravedad. Sin embargo, dicha filtración tiene la desventaja de que se retiene una elevada cantidad de humedad residual en la torta de filtro. Si el producto de purificación deseado está presente en el líquido, se produce una pérdida elevada de producto.

La superficie de base está preferentemente perforada en forma de tamiz. La superficie de base puede constituir el filtro por sí misma o puede servir como base y soporte para un filtro separado.

Según la invención, se podría reducir la humedad residual remanente en la torta de filtro, sorprendentemente, a un mínimo imperceptible utilizando el filtro plano sobre una determinada superficie de base en combinación con un aumento de la presión. Se podrían lograr humedades residuales extracelulares del 0% (% en peso). El líquido intracelular no se considera, a este respecto, humedad residual. Según la invención, se mejoró el aislamiento del sobrenadante sin líquido intracelular, dado que la humedad residual intracelular no representa una pérdida de producto para las proteínas secretadas, y además la población de células intracelulares puede ser una mezcla contaminante.

Según la invención, en formas de realización preferidas, la presión diferencial se mantiene hasta que se alcanza en la torta de filtro una humedad residual extracelular inferior al 3% (% en peso), preferentemente inferior al 2%, de forma más preferida inferior al 1%, o del 0%. La humedad residual se puede determinar como en el ejemplo comparativo 1. En particular, la caja de filtro según la invención puede utilizarse con el filtro mencionado para eliminar la humedad de una torta de filtro de células vegetales, en particular hasta dicha humedad residual.

En formas de realización preferidas, el filtro es una membrana plana. Estos son, por ejemplo, materiales no tejidos, piezas de fundición de cerámica o membranas poliméricas que se utilizan en forma plana. Generalmente, casi no desempeñan ningún papel en aplicaciones a gran escala. Según la invención, no obstante, se ha demostrado que en la filtración de células vegetales se pueden utilizar muy eficazmente filtros planos, en particular en la filtración a presión, e incluso posibilitan una humedad residual más reducida que, por ejemplo, los filtros de bolsa o de saco más comunes.

El sistema de filtración según la invención para el procedimiento según la invención se ha desarrollado en particular para aplicaciones a gran escala. Por lo tanto, las dimensiones de la caja de filtro en unas formas de realización preferidas están diseñadas para la filtración de grandes volúmenes de líquido. De forma particularmente preferida, el volumen interno de la caja de filtro es de por lo menos 2 l (dm³), en particular por lo menos 5 l, por lo menos 8 l, por lo menos 10 l, por lo menos 20 l, por lo menos 30 l, por lo menos 40 l o por lo menos 45 l.

El espacio interior de la caja se puede llenar de forma continua o discontinua con más sobrenadante para su filtración. En formas de realización preferidas se filtran por lo menos 2 l (dm³) de sobrenadante, en formas de realización específicas se filtran por lo menos 5 l, por lo menos 8 l, por lo menos 10 l, por lo menos 20 l, por lo menos 40 l, por lo menos 50 l, por lo menos 75 l o por lo menos 100 l.

Preferentemente, las células no se rompen durante el procedimiento. Esto se puede conseguir mediante un tratamiento suave, a presiones reducidas. Evitar la rotura de las células tiene la ventaja de que el contenido de las células no contamina el producto de filtración y, además, que las células pueden separarse mejor por filtración.

La presión absoluta en el punto de extracción del producto filtrado es de por lo menos 0,7 bares (700 hPa). Según la invención, no se realiza una filtración al vacío, sino que el filtrado permanece a altas presiones atmosféricas de por lo menos 0,7 bares, preferentemente de por lo menos 0,8 bares, por lo menos 0,9 bares o por lo menos 1 bar. De esta forma se evita la evaporación del filtrado líquido (en particular acuoso). Es decir, el aumento de la presión según la invención en la caja de filtro o en la mezcla, en particular en la entrada de la caja de filtro, conduce a una sobrepresión absoluta, es decir, una presión superior a la presión ambiental.

La sobrepresión según la invención (presión diferencial entre el sobrenadante llenado y el líquido filtrado) se puede lograr de distintas formas. La presión se produce mediante aire comprimido (por ejemplo, suministrado en la entrada de la caja de filtro o en un orificio de suministro de aire separado). Además, la presión puede reducirse mediante una presión hidráulica, por ejemplo como una presión dinámica del líquido o mediante una bomba. Otra

posibilidad es el aumento de presión por centrifugación. También es posible una presión mecánica, por ejemplo por medio de un émbolo. Por supuesto, todas estas alternativas también se pueden combinar entre sí. Preferentemente, la mezcla de células con el líquido se suministra en primer lugar a presión y a continuación después de introducir toda la mezcla que se va a filtrar se introduce más líquido a través de aire comprimido. El aire comprimido se puede aplicar a las mismas presiones, idénticas a, o seleccionadas independientemente de, la presión del líquido.

En formas de realización preferidas, la presión diferencial es de por lo menos 0,8 bares (800 hPa), preferentemente por lo menos 1 bar (1000 hPa), o por lo menos 1,2 bares (1200 hPa). En formas de realización especiales, la presión es como máximo de 8 bares, como máximo de 5 bares, como máximo de 3 bares, como máximo de 2 bares o como máximo de 1,5 bares. La diferencia de presión viene determinada en gran medida por el filtro utilizado (tamaño de poro, dimensiones), con la que se genera una determinada resistencia a la presión en una sobrepresión seleccionada en la entrada de la caja de filtro. La sobrepresión seleccionada se puede medir, por ejemplo, con la salida cerrada y es preferentemente una presión absoluta de por lo menos 1,8 bares (1800 hPa), preferentemente por lo menos 2 bares (2000 hPa), o por lo menos 3 bares (3000 hPa).

Por lo tanto, la caja de filtro es preferentemente un recipiente a presión, en particular un recipiente a presión diseñado para presiones de por lo menos 2 bares (2000 hPa), de forma más preferida de por lo menos 5 bares (5000 hPa) o por lo menos 8 bares (8000 hPa).

El tamaño de poro del primer filtro está comprendido entre 4 μm y 50 μm . En formas de realización preferidas, el tamaño de poro del primer filtro está comprendido entre 6 μm y 40 μm o entre 8 μm y 30 μm , en particular entre 9 μm y 250 μm .

La superficie de base perforada con forma de tamiz es plana según la invención y sin curvatura o apenas arqueada. Preferentemente, los orificios en forma de tamiz están dispuestos en forma de anillo. Se encuentran preferentemente a por lo menos 2 cm del borde de la superficie de base, que está conectado de manera sellada a la pared del recipiente. Los orificios de tipo tamiz pueden tener tamaños de 0,001 mm a 5 mm, preferentemente de 0,005 mm a 3 mm, o de 0,01 mm a 1,5 mm, de la forma más preferida de 0,03 mm a 0,06 mm.

La temperatura durante el proceso es preferentemente entre 0 °C y 40 °C, en particular entre 10 °C y 30 °C, para una filtración cuidadosa de las células.

Según la invención, no es necesario lavar adicionalmente la torta de filtro debido a la reducción eficaz de la humedad residual en la misma. Aunque, por supuesto, se puede realizar esta etapa, en formas de realización preferidas la torta de filtro no se lava con líquido adicional. En otras formas de realización, solo se utilizan pequeños volúmenes de líquido de lavado, por ejemplo, como máximo el 1% o como máximo el 0,1% del volumen del sobrenadante y/o como máximo el 5% o como máximo el 2% del volumen de la torta de filtro.

En formas de realización particularmente preferidas, la filtración mencionada anteriormente viene seguida de una filtración adicional, en particular una filtración en profundidad y/o una filtración estéril.

Preferentemente, el procedimiento según la invención comprende además la etapa de: e1) filtrar adicionalmente el líquido filtrado obtenido en la etapa d) con un segundo filtro con un tamaño de poro más pequeño que el primer filtro, encontrándose el tamaño de poro del segundo filtro en el intervalo de 1 μm a 20 μm . El tamaño de poro del segundo filtro está preferentemente en el intervalo comprendido entre 2 μm y 15 μm , en particular en el intervalo comprendido entre 3 μm y 10 μm , en particular entre 4 μm y 8 μm .

Preferentemente, el procedimiento de la invención comprende además la etapa de: e2) filtrar adicionalmente el líquido filtrado obtenido en la etapa d) o e1) con un tercer filtro con un tamaño de poro más pequeño que el segundo filtro, encontrándose el tamaño de poro del tercer filtro en el intervalo de 0,25 μm a 10 micrómetros. El tamaño de poro del tercer filtro está preferentemente en el intervalo comprendido entre 0,3 μm y 5 μm , en particular en el intervalo comprendido entre 0,35 μm y 2 μm , en particular entre 0,4 μm y 1,5 μm .

Preferentemente, el procedimiento según la invención comprende además la etapa de: f) filtrar adicionalmente el líquido filtrado obtenido en la etapa e1) o e2) con un cuarto filtro con un tamaño de poro más pequeño que el tercer filtro, encontrándose el tamaño de poro del tercer filtro en el intervalo de 0,05 μm a 2 μm . El tamaño de poro del cuarto filtro está preferentemente en el intervalo comprendido entre 0,08 μm y 1,5 μm , en particular en el intervalo comprendido entre 0,1 μm y 1 μm , en particular de 0,15 μm a 0,6 μm o a 0,4 μm .

Las indicaciones "primero", "segundo", "tercero" y "cuarto" no significan que el procedimiento según la invención esté limitado a este número de filtros o que se utilice exactamente este número de filtros. Simplemente sirve para distinguir diferentes filtros con diferentes tamaños de poro. Preferentemente, en el procedimiento según la invención, se realizan 1, 2, 3, 4 o más etapas de filtración, presentando los filtros, en formas de realización preferidas, en etapas posteriores un tamaño de poro más pequeño que los filtros de la etapa anterior.

Como materiales de filtro para el primer, segundo, tercer y/o cuarto filtro se consideran cualesquiera filtros que sean adecuados para la filtración celular. Los materiales ejemplares, por ejemplo, están constituidos por celulosa o membranas poliméricas. Algunos ejemplos son membranas de polietersulfona (tales como, por ejemplo, filtros Sartopore) o filtros de celulosa/tierra de diatomeas/perlita (tales como los filtros de la serie K de Seitz).

Las células que se van a utilizar en el procedimiento según la invención son preferentemente células vegetales, preferentemente de una briofita, en particular seleccionada del grupo constituido por musgos y hepáticas, utilizándose de forma particularmente preferente especies de los géneros *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum* y *Ceratodon*, o *Marchantia* y *Sphaerocarpos*. Es particularmente preferido *Physcomitrella patens*. De la forma más preferida, el procedimiento según la invención se lleva a cabo utilizando células, plantas o tejidos vegetales tales como protonema del musgo *Physcomitrella patens*. Otras plantas preferidas son el tabaco, las alubias o las lentejas. Preferentemente, la planta es una planta acuática, por ejemplo de los géneros *Lemna*, *Spirodela*, *Landoltia*, *Wolffia* o *Wolffiella*.

El procedimiento según la invención es particularmente adecuado para filtrar las células con una pared celular. Además de auténticas células vegetales, las células también pueden seleccionarse a partir de una célula fúngica o una célula de alga, que se consideran formas de realización equivalentes. "Célula", tal como se utiliza en el presente documento, puede referirse a células aisladas, células purificadas o una célula de un organismo pluricelular. Una célula vegetal puede ser una única célula vegetal o una célula en una planta o en un tejido vegetal. Análogamente, una célula fúngica puede ser una célula única o una célula en un hongo o en un tejido fúngico. La célula de alga es preferentemente una célula de alga verde. Los tejidos pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre floema, xilema, mesófilo, tallo, hojas, talos, protonema, cloronema, caulonema, rizoides o gametóforos. Las células pueden comprender, o consistir en, protoplastos o células parenquimatosas, en particular células del callo.

Otras células adecuadas son células bacterianas siempre que presenten una pared celular. Aunque la invención se optimizó por primera vez para células vegetales, pueden observarse las mismas ventajas, tales como un tratamiento cuidadoso de las células con un alto grado de separación de líquido, también en caso de células bacterianas.

Preferentemente, en el líquido sobrenadante se encuentra una proteína recombinante producida por las células vegetales. Adicionalmente o en combinación con lo expuesto en el presente documento, es posible purificar con la filtración del líquido una proteína recombinante del sobrenadante. La producción recombinante de proteínas en plantas es bien conocida tal como se menciona en la introducción, y se pueden utilizar los procedimientos habituales para la transformación y la expresión en plantas.

La presente invención se refiere además al uso de un kit con una caja de filtro tal como se describe en el presente documento y con un volumen interior de por lo menos 2 l, siendo la caja de filtro un recipiente a presión con una entrada y una abertura de entrada de aire, y un primer filtro tal como se describe en el presente documento, por ejemplo con un tamaño de poro de entre 4 µm y 50 µm, en el procedimiento según la invención. El kit o el sistema, preferentemente, pueden estar equipados adicionalmente con un segundo, tercer y/o cuarto filtro tal como se describe en el presente documento. Este kit o el sistema son aptos para llevar a cabo los procedimientos de la invención o se utiliza para este fin.

La invención también se refiere al uso del kit según la invención o sus constituyentes para eliminar la humedad de una torta de filtro de células (vegetales).

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin limitarse a estas formas de realización específicas de la invención.

Figuras:

La figura 1 muestra una sección transversal a través de una caja de filtro según la invención con una placa inferior (2), una tapa (3) y una superficie de base con forma de tamiz (4) del espacio de llenado como base para un material de filtro. La tapa se cierra herméticamente a presión mediante una conexión de tornillo desmontable (5) con la pared de caja cilíndrica (1). La caja dispone además de una entrada (6) y una salida (7).

La figura 2 muestra los resultados del análisis después de la purificación de la materia en suspensión mediante mediciones de la turbidez (NTU [-], A) y las pérdidas de producto (título [mg/l], B) con el sistema Supradisc durante la filtración en profundidad. (1 = sobrenadante del cultivo, 2 = filtrado K900 exento de musgo, 3 = filtrado K700, 4 = filtrado KS50, 5 = filtrado estéril)

La figura 3 muestra los resultados del análisis después de la purificación de la materia en suspensión mediante mediciones de la turbidez (NTU [-], A) y las pérdidas de producto (título [mg/l], B) con el sistema Supracap durante la filtración en profundidad. (1 = sobrenadante del cultivo, 2 = filtrado K900 exento de

musgo, 3 = filtrado K700, 4 = filtrado KS50, 5 = filtrado estéril)

Ejemplos:

5 Ejemplo comparativo 1

A pequeña escala, se separó un sobrenadante con anticuerpo producido de forma recombinante (IgG1 H10 específico del antígeno carcinoembrionario (CEA)) de los tejidos de protonema de musgo productores, densidad celular a 7 g/l. A este respecto, se utilizó un tamiz con un tamaño de poro de 100 µm, el contenido de humedad residual remanente fue de aproximadamente el 50%.

Se buscó al aumentar la producción procedimientos de filtro adecuados. A este respecto la primera filtración debe realizarse a través de un filtro relativamente grueso. Esto evita el bloqueo del filtro y sirve principalmente para separar el musgo y el sobrenadante. Los efectos de filtración en profundidad durante la etapa de filtración de clarificación no fueron muy significativos.

En una primera etapa de infiltración, se realizó una filtración con bolsa (empresa: Eaton, tipo de caja: TBF-0101-AD10-050D, filtro de bolsa Artículo N°: F5869549, volumen 13 l). El filtro se dispuso en una pieza insertada de la caja con una superficie de base curvada, perforándose la pieza insertada en la superficie de base y en la pared de pieza insertada como un tamiz. La filtración se realizó con éxito, pero la humedad residual en el musgo separado era muy alta y no se pudo extraer por compresión del musgo mediante aire comprimido (1-3 bares).

La humedad residual extracelular se determinó después de completar la filtración retirando la torta de filtro y prensándola manualmente. Una comparación volumétrica del líquido extraído por compresión y el material de musgo retenido dio una proporción de aproximadamente el 50%. Esto se asoció con una gran pérdida de producto no medida por separado.

Ejemplo comparativo 2

El sobrenadante con el anticuerpo producido de forma recombinante a partir de tejidos de musgo productores se separó por filtración de forma análoga al ejemplo comparativo 1 en un experimento a escala aumentada. Se utilizó una pieza insertada de caja alternativa con una superficie de base curvada, perforándose esta vez solo la superficie de base de la pieza insertada en forma de tamiz. Esto se realizó para asegurar que el aire comprimido se escapara de forma homogénea a través de la torta de filtro y se eliminara la humedad residual del residuo de musgo. Este no fue el caso. La humedad residual se determinó como en el ejemplo comparativo 1 y también fue de aproximadamente el 50% (% en peso).

Ejemplo 1: Filtración de gran volumen

Se desarrolló una nueva caja de filtro, que debería presentar menos humedad residual en células vegetales separadas. La nueva caja se representa en la figura 1. La caja de filtro está caracterizada por una pieza insertada con forma de tamiz (4) como base plana para un material de filtro. La pared de la caja no sirve como superficie de filtro. Todo el fluido filtrado debe pasar a través de la placa inferior plana en su recorrido hacia la salida. En el caso de células animales, este filtro tendería a obstruirse rápidamente debido a la reducida área superficial del filtro. Sin embargo, en el caso de las células vegetales, se ha demostrado que no solo es posible llevar a cabo la filtración con grandes volúmenes (> 5 l), sino que, sorprendentemente, también ofrece la ventaja de una humedad residual reducida.

La caja está equipada con un disco de filtro Seitz K900 (tamaño de poro 8-20 µm, Pall). La caja se ha sido diseñado para una escala técnica de hasta 500 l y puede adaptarse para cualquier volumen de sobrenadante de cultivo. Los ensayos con esta caja de filtro proporcionaron buenos datos. Un ensayo realizado con 500 l de caldo de cultivo y una biomasa reducida (0,5 g/l), así como varios experimentos con 100 l de caldo de cultivo con una biomasa elevada (4 a 7 g/l), pudieron lograr una humedad residual extracelular del 0% (determinada como en el ejemplo comparativo 1) en la torta de filtro. Esto significa que el sobrenadante del caldo de cultivo en este módulo se extrae por compresión sucesivamente sobre la torta de filtro completa, el filtro y fuera de la caja de filtro. Las pérdidas de producto de un anticuerpo en mg/l también fueron muy bajas (del 4 al 13%, etapa 1 de la tabla 1). Las pérdidas se producen en este caso solamente mediante la permanencia no específica del producto en la torta de musgo o el filtro. Pero no por permanencia del sobrenadante del cultivo en la torta de filtro.

60 Ejemplo 2: filtración en profundidad y estéril

Para la filtración en profundidad y estéril, el filtrado según el ejemplo 1 se filtró adicionalmente: Para la filtración en profundidad se filtró con un disco de filtro Seitz K700 (tamaño de poro 6-12 µm, Pall) y un disco de filtro Seitz KS50 (tamaño de poro 0,4-1 µm, Pall). Estas filtraciones se pueden realizar secuencialmente en una caja y en una pasada, o se pueden realizar por separado en cajas separadas. El espaciado de los filtros se eligió de forma que hubiera un espacio suficiente para las células de musgo o los fragmentos celulares. Los filtros se montaron

en dos tramos paralelos según los sistemas SUPRADisc™ (Pall) y Supracap™ 100 (Pall) (filtros Supradisc: 300P700S205SP y 200P050S205SP, filtros Supracap: NP6P7001 y NP6P0501).

5 Para la filtración estéril, el filtrado se filtró adicionalmente con un disco de filtro Sartopore 2 (tamaño de poro 0,2 µm, de Sartorius).

Ejemplo 3: Resultados

10 Con la caja de filtro desarrollada se puede garantizar una separación óptima sólido-líquido. Forma una torta de filtro sólida, que está en gran parte exenta de humedad residual y, por lo tanto, mantiene unas pérdidas de producto reducidas. La totalidad del proceso garantiza que las etapas de purificación adicionales se puedan llevar a cabo rápidamente sin obstruir los filtros.

15 Las figuras 2 y 3 muestran los resultados. Se muestran el análisis de la purificación de sólidos en suspensión por filtración a través de mediciones de la turbidez (NTU) y el desarrollo de pérdidas de anticuerpos por medio de filtración, respectivamente para la purificación a través del sistema Supradisc (figura 2) y la purificación a través del sistema Supracap (figura 3), durante la filtración en profundidad. La tabla 1 resume las pérdidas de producto.

20 Tabla 1: Pérdidas de producto durante la purificación a través de los sistemas Supradisc y Supracap.

Etapa de filtración	Supradisc: Rendimiento [%]	Pérdida [%]	Supracap: Rendimiento [%]	Pérdida [%]
1: K900	86,84	-13,15	95,26	-4,73
2: K700	68,48	-31,51	89,50	-10,49
3: KS50	74,33	-25,66	86,41	-13,58
4: Filtr. estéril	103,57	3,57	96,42	-3,57
total	45,78	-54,21	71,05	-28,94

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la separación de un sobrenadante líquido de células con una pared celular, que comprende las etapas siguientes:
- 5 a) proporcionar una mezcla de las células con un líquido,
- b) llenar una caja de filtro con la mezcla, en la que un primer filtro con un tamaño de poro de entre 4 μm a 50 μm está previsto sobre una superficie de base plana en la caja de filtro y estando conectadas las
- 10 paredes de la caja de filtro de manera sellada a la superficie de base perforada plana con forma de tamiz,
- c) aplicar una presión diferencial de por lo menos 0,5 bares a la mezcla por medio de aire comprimido, con lo que la porción líquida de la mezcla es presionada a través del filtro y una torta de filtro que contiene células permanece en la caja de filtro, siendo la presión absoluta en el punto de extracción de por lo
- 15 menos 0,7 bares,
- d) extraer el líquido filtrado.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el volumen interno de la caja de filtro es de por lo menos 2 l.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que por lo menos 10 l de sobrenadante son filtrados.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que las células no se rompen durante el procedimiento.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la presión absoluta en el punto de extracción es de por lo menos 0,8 bares.
- 30 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la presión diferencial es de por lo menos 0,8 bares, preferentemente de por lo menos 1 bar.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la caja de filtro es un recipiente a presión, en particular un recipiente a presión diseñado para presiones de por lo menos 2 bares, de forma particularmente preferida de por lo menos 5 bares.
- 35 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la temperatura durante el procedimiento está comprendida entre 0 °C y 40 °C.
- 40 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la torta de filtro no es lavada por medio de un líquido adicional, y/o en el que se extrae líquido de la torta de filtro por medio de aire comprimido.
- 45 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende adicionalmente la etapa de: e1) filtrar adicionalmente el líquido filtrado obtenido en la etapa d) con un segundo filtro con un tamaño de poro más pequeño que el primer filtro, encontrándose el tamaño de poro del segundo filtro en el intervalo comprendido entre 1 μm y 20 μm .
- 50 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende adicionalmente la etapa de: e2) filtrar adicionalmente el líquido filtrado obtenido en la etapa d) o e1) con un tercer filtro con un tamaño de poro más pequeño que el segundo filtro, encontrándose el tamaño de poro del tercer filtro en el intervalo comprendido entre 0,3 μm y 10 μm .
- 55 12. Procedimiento según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, que comprende adicionalmente la etapa de: f) filtrar adicionalmente el líquido filtrado obtenido en la etapa e1) o e2) con un cuarto filtro con un tamaño de poro más pequeño que el tercer filtro, encontrándose el tamaño de poro del tercer filtro en el intervalo comprendido entre 0,05 μm y 2 μm .
- 60 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que las células son células vegetales, específicamente células briófitas, preferentemente células de musgo, de forma particularmente preferida células de *Physcomitrella patens*.
- 65 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que una proteína recombinante producida por las células está presente en el líquido sobrenadante, y/o por que con la filtración del líquido una proteína recombinante del sobrenadante es purificada.

- 5 15. Uso de un kit que comprende una caja de filtro tal como se define en una de las reivindicaciones 1, 2 o 7 y con un volumen interno de por lo menos 2 litros, siendo la caja de filtro un recipiente a presión con una entrada y una abertura de suministro de aire, y un primer filtro con un tamaño de poro comprendido entre 4 μm y 50 μm , preferentemente adicionalmente con un segundo, tercer y/o cuarto filtro tal como se definen en una de las reivindicaciones 10 a 12, en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, en particular para eliminar la humedad de una torta de filtro de células.

Fig. 1

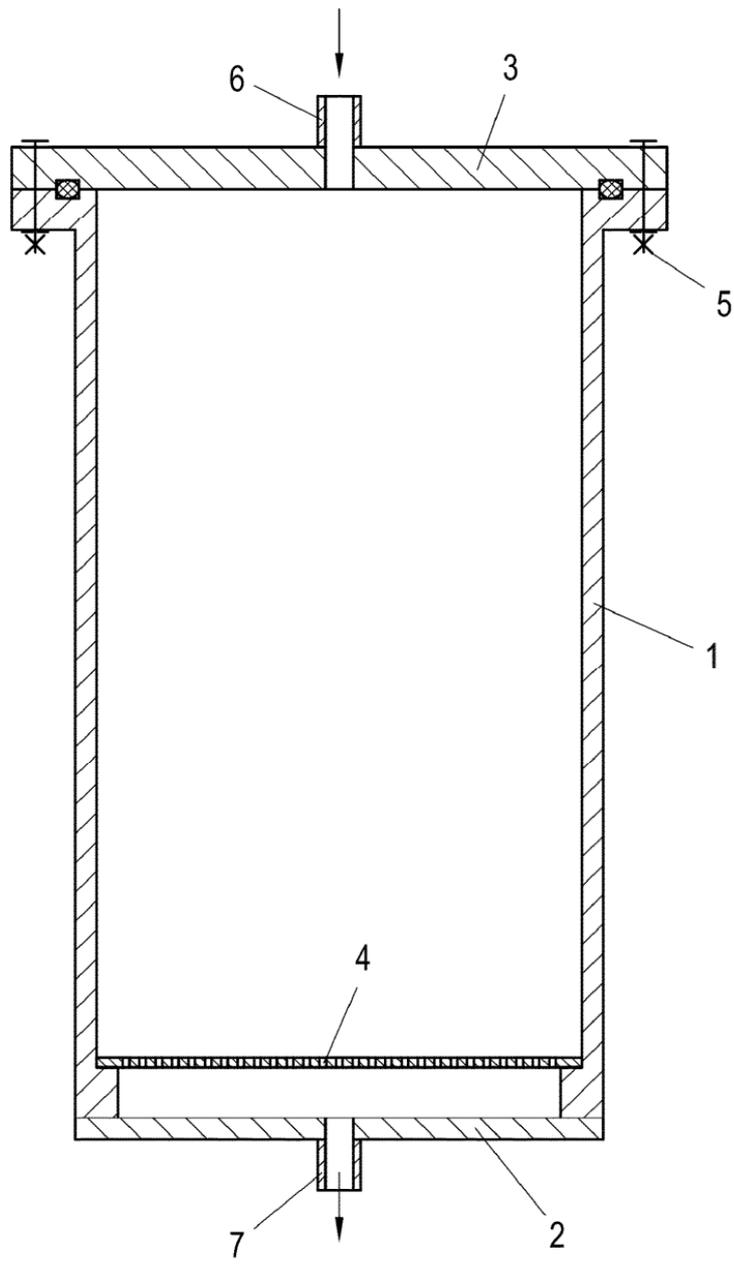
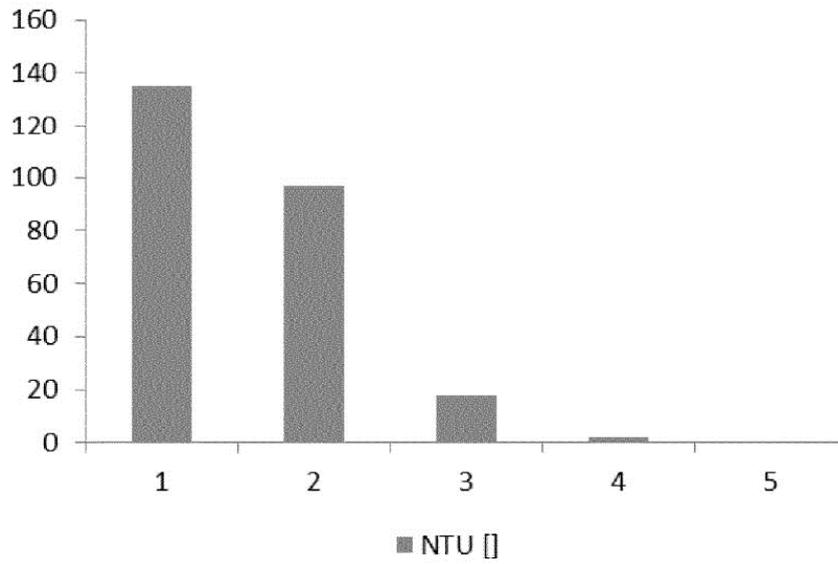


Fig. 2

A:



B:

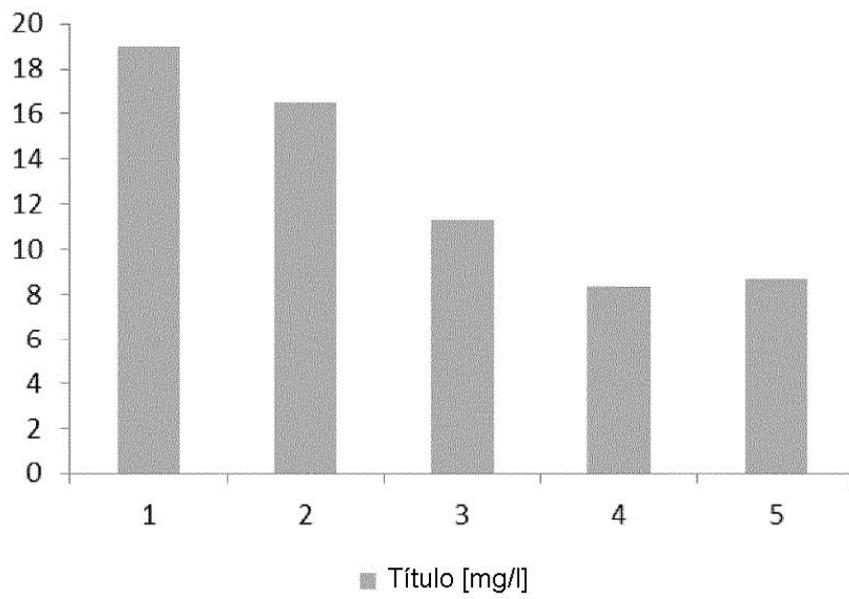
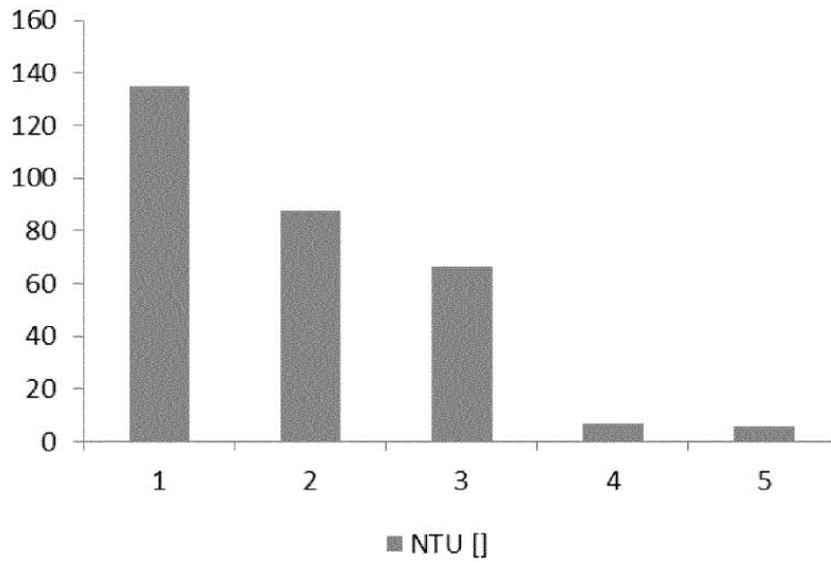


Fig. 3

A:



B:

