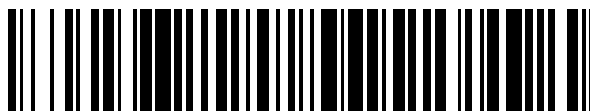


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 820**

51 Int. Cl.:

G01N 1/10 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/10 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2013 PCT/US2013/074857**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14120344**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2013 E 13874031 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2951552**

54 Título: **Dispositivo de captura directa desechable**

30 Prioridad:

31.01.2013 US 201361759142 P

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

09.10.2019

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
400 Summit Drive
Burlington, MA 01803, US**

72 Inventor/es:

CACACE, BENJAMIN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 726 820 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

Dispositivo de captura directa desechable

Campo de la invención

5 Las realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a un dispositivo de preparación de muestras, flexible, desechable, que contiene una fibra funcionalizada adsorbente adecuada para la purificación por unión y elución de muestras líquidas que contienen biomoléculas de interés.

Antecedentes de la invención

10 Actualmente existen varios métodos para separar, purificar o preparar muestras de líquidos biológicos y/o químicos. La cromatografía de lecho fluidizado y las columnas de cromatografía rellenas con medio de separación se han empleado con éxito variable para separar y/o purificar sustancias biológicas y/o químicas de interés de muestras líquidas con respecto al rendimiento, tiempo de consumo, pureza y costo.

El proceso de plantilla principal para la recolección comercial de anticuerpos monoclonales (mAbs) es eliminar las células visibles (turbidez) y los desechos celulares a través de un tren de clarificación, luego cargar directamente en una columna tradicional de cromatografía de captura/elución basada en perlas.

15 La aclaración es típicamente un proceso de dos paradas. La primera etapa se materializa en filtros de profundidad o una centrifugadora de pila de discos. Actualmente, los filtros de profundidad totalmente desechables no son adecuados para su uso con ninguna técnica de esterilización actual. El uso de filtros de profundidad en carcasas de acero inoxidable permite el uso de vapor para la esterilización, pero añade hardware y la necesidad de limpieza y validación de la limpieza. Los filtros de profundidad están limitados en lo que se refiere a la densidad de celdas y al tamaño total del lote para los que son prácticos. El uso de una centrífuga de pila de discos elimina algunas de las limitaciones de rendimiento de los filtros de profundidad para la clarificación primaria, pero trae consigo muchos de sus propios desafíos en cuanto a limpieza, operación aséptica y escalabilidad. La clarificación secundaria generalmente se realiza con filtros de profundidad con los mismos desafíos asépticos que cuando se usan para la clarificación primaria. Las limitaciones de rendimiento para la clarificación secundaria se producen principalmente cuando hay presente una gran concentración de partículas pequeñas. Típicamente, se emplea un filtro de membrana final para reducir la carga biológica y para proteger las etapas de cromatografía aguas abajo que podrían resultar fácilmente contaminados por los sólidos restantes.

20 El ligando de elección para la etapa de cromatografía es típicamente Proteína A usando intercambio de cationes ocasionalmente. El hardware requerido para empaquetar y operar las columnas de cromatografía a escala piloto y a mayor escala es significativo, y requiere un empaquetado y una caracterización cuidadosos. Debido al alto costo de la resina y al esfuerzo requerido para empaquetarlas en un lecho efectivo, típicamente, las columnas se limpian en su sitio y se reutilizan a través de una campaña o periodo o hasta el final de la vida útil de la resina.

25 Los procedimientos de clarificación actuales se esfuerzan en conseguir condiciones asépticas (centrifugadora continua, dispositivos de filtro de profundidad celulósicos desechables). La cocción al vapor de los dispositivos celulósicos actualmente solo es segura en carcasas de acero inoxidable de uso altamente intensivo que posteriormente requieren limpieza. El requisito aséptico es más importante para la recolección de vacunas o el procesamiento de espacios grises.

30 Además, los procedimientos de clarificación actuales se esfuerzan en clarificar las cosechas con sólidos muy altos o altas concentraciones de partículas pequeñas, y tienen problemas para conseguir un buen rendimiento con cosechas de titulaciones bajas.

35 Recientemente, se han llevado a cabo procedimientos de clarificación alternativamente en instalaciones en las que los componentes en contacto con el líquido de la muestra son componentes de un solo uso.

40 Dichos componentes de un solo uso tienen la ventaja de evitar las operaciones de limpieza, pero, para proporcionar el grado de seguridad requerido, la implementación de una instalación con dichos componentes requiere operaciones de selección, ensamblaje y verificación que son relativamente complejas.

45 Por consiguiente, sería deseable disponer de procedimientos y componentes de clarificación de procesos para el tratamiento de muestras y fuentes biológicas líquidas que sean convenientes de implementar, más simples, menos costosas y que se basen en componentes de un solo uso que tengan bajas demandas de propiedades de lecho al depender de la unión estática, y que no requieran un cuidadoso empaquetamiento de las columnas y/o una caracterización que requiera equipos especializados y diseños de dispositivos relativamente costosos.

50 El documento WO2011/041508 describe una bolsa de condensador de biorreactor desechable y un calentador de filtro.

El documento JP2012000241 describe un purificador de sangre y una herramienta de fijación para el purificador de sangre.

El documento WO 2011/025890 A1 describe una bolsa de recolección de recuperación continua.

Sumario de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un dispositivo flexible, plegable, desechable, de forma bidimensional o tridimensional, que tiene un compartimiento interno definido por paredes laterales, una superficie interior, una superficie exterior, una entrada para recibir muestras líquidas y una alimentación que contiene una biomolécula de interés, una salida para descargar las muestras de líquido procesadas y la alimentación, y un elemento adsorbente de gran área de superficie contenido en el interior del compartimiento interno del dispositivo que tiene un primer extremo y un segundo extremo, en el que ambos extremos están fijados a la superficie interior del dispositivo por medio de tiras poliméricas alargadas. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un dispositivo flexible y desechable, tal como una bolsa o una bolsita, para purificar una muestra líquida biofarmacéutica y/o una alimentación para obtener productos de biomoléculas, tales como vacunas, proteínas recombinantes, células, células madre, anticuerpos monoclonales (mAbs), proteínas, anticuerpos, péptidos, oligopéptidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, ARN, ADN, oligosacáridos y polisacáridos.
- 10 En ciertas realizaciones de la presente invención, el elemento adsorbente es una cortina o una estructura similar a una pared u otra configuración similar de fibras poliméricas ensambladas sustancialmente paralelas entre sí y fijadas a la pared lateral interior de la bolsa.
- En ciertas realizaciones de la presente invención, el elemento adsorbente es una cortina, o una estructura similar a una pared, o un lecho de fibra(s) con forma, u otra configuración similar de fibras poliméricas ensambladas sustancialmente paralelas entre sí y sustancialmente paralelas a las dimensiones más largas de la bolsa, y fijadas a los lados laterales interiores opuestos de la bolsa, próximos a la periferia superior y a lo largo de la misma, y próximos a la periferia inferior de la bolsa y a lo largo de la misma.
- 20 En ciertas realizaciones de la presente invención, el dispositivo es una bolsa, bolsita, receptáculo, etc., poliméricos colapsables.
- En ciertas realizaciones de la presente invención, las fibras están funcionalizadas con fibras hiladas por fusión de alta área superficial.
- 25 En ciertas realizaciones de la presente invención, el dispositivo es muy adecuado para la purificación por unión/elución de bajo coste, especialmente a partir de corrientes de fluido sin tratar que contienen niveles altos de sólidos y/o bajas concentraciones de proteínas (por ejemplo, la captura directa desde un fluido de recolección de células o desde agrupaciones de replegamiento).
- 30 En otras realizaciones de la presente invención, la configuración paralela de las fibras junto con la baja cantidad inicial de fibras en comparación con el fluido permite que los fluidos que contienen sólidos, tales como células y sus residuos, sean introducidos y sean puestos en contacto con las fibras con agitación sin que los sólidos queden atrapados mecánicamente en la matriz de la fibra.
- En otras realizaciones, la invención proporciona un dispositivo suministrado seco y preesterilizado.
- 35 En una realización, el cuerpo comprende una bolsa bidimensional en forma de almohada en la que dos láminas de material polimérico extruídas o formadas de otra manera son colocadas en una relación superpuesta y las dos láminas son unidas entre sí en sus periferias para formar un compartimiento interno. Alternativamente, una única lámina de material polimérico extruída o formada de otra manera puede ser plegada y cosida alrededor de la periferia para formar un compartimiento interno.
- 40 En otras realizaciones más, la bolsa se forma extruyendo inicialmente o formando de otro modo una lámina polimérica en forma de un tubo continuo, en el que el tubo se corta a la longitud y cada extremo se cierra para formar una bolsa bidimensional de tipo almohada. En una realización alternativa, cada extremo se puede plegar como el extremo de una bolsa de papel y luego se puede cerrar para formar un cuerpo de tres dimensiones.
- En otras realizaciones de la presente invención, la bolsa comprende una única lámina integral de material polimérico extruída que comprende dos o más capas de diferentes materiales separadas por una capa de contacto, en la que todas ellas se coextruyen simultáneamente.
- 45 En otras realizaciones de la presente invención, la fibra conformada funcionalizada de alta área superficial comprende medios de adsorción para cromatografía, particularmente cromatografía de intercambio iónico.
- En otras realizaciones de la presente invención, la fibra conformada funcionalizada contiene una estructura acanalada o en forma de ala fibrilada que aumenta enormemente el área superficial de las fibras.
- 50 En otras realizaciones, la presente invención incluye un procedimiento para añadir grupos funcionales colgantes de superficie a fibras conformadas de área superficial alta que proporcionan una funcionalidad de intercambio catiónico o de intercambio aniónico. Esta funcionalidad colgante es útil para la purificación cromatográfica de intercambio iónico de biomoléculas, tales como los anticuerpos monoclonales (mAbs).

En otras realizaciones de la presente invención, las especies y/o los contaminantes no deseados se eliminan de un fluido de muestra y se alimentan mientras se mantienen los sólidos como el producto (por ejemplo, purificación de células madre).

5 Las características, los aspectos y las ventajas adicionales de la invención se expondrán en la descripción detallada y en las reivindicaciones siguientes. Pueden realizarse muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin apartarse de su espíritu y alcance, como será evidente para los expertos en la técnica. Debe entenderse que la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada, las reivindicaciones, así como los dibujos adjuntos son solo ejemplos y explicativos, y están destinados a proporcionar una explicación de varias realizaciones de las presentes enseñanzas. Las realizaciones específicas descritas en este documento se ofrecen solo a modo de ejemplo
10 y no pretenden ser limitantes de ninguna manera.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una representación fotográfica de un dispositivo de preparación de muestras líquidas según ciertas realizaciones;

15 La Fig. 2 es una representación fotográfica de un dispositivo de preparación de muestras líquidas según ciertas otras realizaciones;

La Fig. 3 es una representación fotográfica de un dispositivo de preparación de muestras líquidas que contiene una muestra líquida según ciertas otras realizaciones;

20 La Fig. 4 es una representación fotográfica recortada de un dispositivo de preparación de muestras líquidas que contiene una muestra líquida según ciertas otras realizaciones.

La Fig. 5 es una representación fotográfica recortada de un dispositivo de preparación de muestras líquidas que contiene una muestra líquida según ciertas otras realizaciones;

La Fig. 6 representa una representación esquemática de carga, lavado y elución de un dispositivo de preparación de muestras líquidas según ciertas otras realizaciones;

25 La Fig. 7 es un gráfico que muestra la turbidez frente a la dilución del volumen procesado de la muestra líquida que contiene células usando el dispositivo de preparación de muestras líquidas según ciertas otras realizaciones.

Las Figs. 8A y 8B son gráficos de alimentación y de flujo usando el dispositivo de preparación de muestras líquidas según ciertas otras realizaciones; y

30 La Fig. 9 es un gráfico de elución usando el dispositivo de preparación de muestras líquidas según ciertas otras realizaciones.

Descripción de las realizaciones

35 Para los propósitos de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, porcentajes o proporciones de materiales, condiciones de reacción y otros valores numéricos utilizados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente".

40 En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la siguiente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener con la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos según el número de dígitos significativos indicados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo ordinarias.

45 A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se indican como los ejemplos específicos y se indican con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de ensayo. Además, debe entenderse que todos los intervalos descritos en el presente documento abarcan todos los subintervalos incluidos en los mismos.

Fibras conformadas

50 La fibra puede tener la forma de una longitud continua, tal como un hilo o un monofilamento de longitud indeterminada o puede formarse en fibras individuales más cortas, tales como telas no tejidas o tejidas, cortando la fibra de longitud continua en piezas individuales, formadas por un procedimiento de crecimiento cristalino. etc.

Preferiblemente, las fibras están hechas de polímeros termoplásticos. Los polímeros termoplásticos incluyen poliolefinas, polipropileno, poliamida, fibras revestidas de polietileno/polipropileno, polisulfona, polietersulfonas, poliarilsulfonas, polifenilsulfonas, polímeros cristalinos líquidos de cloruros de polivinilo, poliésteres tales como tereftalato de polietileno, incluyendo polietilenos de peso molecular ultraelevado, tereftalato de polibutileno, copoliésteres, etc., y elastómeros termoplásticos, fluoruro de polivinilideno (PVDF) que incluyen, pero no se limitan a, elastómeros de poliuretano (TPU) tales como poliésteres, poliéter ésteres y PBAX y olefinas elastoméricas, y acrilatos tales como polimetilmetacrilato, polímeros estirénicos y mezclas de los anteriores.

En ciertas realizaciones, la sección transversal de la fibra generalmente tiene forma de ala, con una región del cuerpo principal que define un eje sustancialmente longitudinal, y una pluralidad de proyecciones que se extienden radialmente hacia afuera desde la región del cuerpo principal. Las proyecciones forman una serie de canales colineales que se extienden a lo largo de la longitud de la fibra, generalmente de 20 a 30 canales de este tipo por fibra, y la longitud de las proyecciones es más corta que la longitud de la región del cuerpo principal.

Los anchos de canal adecuados entre las proyecciones están comprendidos entre aproximadamente 200 nanómetros y aproximadamente 1.000 nanómetros. Las fibras adecuadas se describen en la patente US N° 6.811.874B2 de Tanaka et al., titulada "Composite Fiber"; en la publicación de patente US N° 2008/0105612, de Chappas, titulada "Composite Filter Media With High Surface Area Fibers", y en la publicación de patente US N° 2012/0029176, de Yavorsky et al., titulada "Chromatography Media And Method".

Las fibras pueden ser un medio cromatográfico húmedo o seco esterilizado. En un aspecto preferido, el medio cromatográfico húmedo o seco es estéril. La bolsa puede ser esterilizada por tratamiento con radiación, esterilización en autoclave o desinfectantes químicos. La radiación gamma es particularmente efectiva. Pueden usarse también tratamientos más leves para reducir la carga microbiana o el número total de microbios, tales como bacterias y hongos, presentes en el medio.

Fibras conformadas funcionalizadas

Se proporcionan procedimientos de tratamiento químico para funcionalizar dichas superficies de liberación para permitir separaciones biomoleculares y biológicas basadas en interacción o interacciones de adsorción. El procedimiento de tratamiento químico puede impartir una diversidad de funcionalidades químicas superficiales a dichas fibras basadas en interacciones iónicas, de afinidad o hidrófobas o una combinación de interacciones o combinaciones de dichas fibras basadas en interacciones iónicas, de afinidad o hidrófobas o combinaciones de interacciones. Las economías combinadas de la producción de fibra y del simple proceso de tratamiento químico de la superficie producen una tecnología económica y fácilmente escalable para operaciones de purificación en biofarmacéutica y en la producción de vacunas.

La funcionalización de la superficie de las fibras conformadas de alta área de superficie puede conseguirse mediante un proceso de dos etapas. Según lo dispuesto en la publicación de patente US N° 2012/0029176, de Yavorsky et al., un proceso de funcionalización adecuado es la polimerización por injerto. La funcionalización comienza con la unión de grupos alilo colgantes a la superficie de la fibra de nailon 6 mediante el tratamiento de las fibras con alilglicidil éter en presencia de hidróxido de sodio acuoso a 50°C durante 12 horas. Los grupos alilo colgantes sirven como sitios de anclaje en la superficie de la fibra como puntos de unión para la funcionalidad de acrilamida colgante. Se proporcionan las condiciones para la polimerización en solución de monómeros de acrilamida y los grupos alilo colgantes en la superficie de la fibra se unen a las cadenas poliméricas en crecimiento en solución. De esta manera, las fibras funcionalizadas con alilo son tratadas posteriormente con una solución acuosa de ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propano sulfónico, N,N-dimetilacrilimida y persulfato de amonio a 80°C durante 4 horas. Tras calentar a 80°C, la descomposición de persulfato inicia una polimerización por radicales libres de los monómeros acrílicos. En estas condiciones, los grupos alilo colgantes en la superficie de la fibra sirven como puntos de unión para la funcionalidad de polímero acrílico colgante. De esta manera, el polímero acrílico se une covalentemente a la superficie de la fibra.

En ciertas realizaciones, el polímero de acrilamida puede prepararse por separado, y posteriormente puede aplicarse a las fibras de nailon como un revestimiento superficial. Las fibras de superficie revestida resultantes demostraron capacidades de unión de IgG comparables al material injertado con alilo.

Según ciertas realizaciones, la funcionalización comienza con la deposición de un revestimiento reticulado de acrilato de hidroxipropilo (HPA) y N,N'-metilenebis(acrilamida) (M.BAm) sobre la superficie de las fibras de alta área superficial. Esta etapa proporciona una funcionalidad hidroxilalquilo reactiva para una posterior polimerización redox iniciada por ión cérico de un monómero de acrilamida.

Las fibras tratadas con HPS/MBAm se hacen reaccionar con una solución acuosa de sal sódica de ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, nitrato de amonio cerio (IV) y HNO₃ a 35°C bajo una atmósfera de nitrógeno. En estas condiciones, la oxidación de cerio de la funcionalidad hidroxilalquilo (hidroxipropilacrilato) reticulada en la superficie de la fibra genera radicales libres en la superficie de la fibra e inicia una polimerización de injerto superficial del monómero de ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico. En tales condiciones, el proceso de polimerización iniciado en la superficie produce un "tentáculo" polimérico de monómero polimerizado (ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico). De esta manera, el polímero de acrilamida se une covalentemente a la superficie de la fibra. Dichos

procesos se conocen como polimerizaciones de injerto.

Los grupos químicos (grupos de unión y/o ligando) responsables de atraer y retener las entidades que se desean capturar. Alternativamente, el polímero posee grupos químicos que pueden modificarse fácilmente para incorporar los grupos de unión. El revestimiento o la cobertura es permeable de manera que las impurezas puedan ser capturadas en la profundidad del revestimiento o de la cobertura, aumentando la capacidad de adsorción. El polímero preferido es una amina primaria polimérica. Los ejemplos de aminas primarias poliméricas adecuadas incluyen polialilamina, polivinilamina, polibatilamina, polilisina, sus copolímeros entre sí y con otros polímeros, así como sus respectivas formas protonadas. Los copolímeros adecuados incluyen alcohol vinílico-co-vinilamina, acrilamida-co-alilamina, etilenglicol-co-alilamina y alilamina-co-N-isopropilacrilamida. Se ha encontrado que un revestimiento o una cobertura hechos de polialilamina (y/o su forma protonada, por ejemplo, clorhidrato de polialilamina (PAH)) es particularmente útil. El PAA está disponible comercialmente (Nitto Boseki) en varios pesos moleculares, generalmente en el intervalo de 1.000 a 150.000, y todos estos pueden usarse para crear un sorbente de membrana, el PAA y el PAH son fácilmente solubles en agua. El pH de la solución acuosa de PAA es de aproximadamente 10-12, mientras que el del PAH es de 3-5. El PAA y el PAH pueden usarse de manera intercambiable, sin embargo, el pH de la solución final debe ser supervisado y, si es necesario, debe ser ajustado al valor superior a 10 de manera que los grupos amino no protonados estén disponibles para la reacción con un reticulador.

Estructura del dispositivo de preparación de muestras

Las figuras 1-6 representan un dispositivo 20 de preparación de muestras, flexible, desechable, que comprende un cuerpo 30 plegable flexible que tiene un compartimento 32 interno definido por una pared 34 lateral no porosa y que tiene una superficie 36 interior, una superficie 38 exterior, un primer extremo 60 que termina en una periferia 62 superior, un segundo extremo 70 que termina en una periferia 72 inferior, una entrada 52 para recibir la muestra líquida y una salida 54 para descargar el líquido tratado y un elemento 40 polimérico adsorbente de gran área superficial contenido en el interior del compartimento interno del cuerpo, en el que el elemento polimérico adsorbente tiene un primer extremo 42 y un segundo extremo 44, en el que los extremos primero y segundo están unidos a la superficie interior del cuerpo.

El cuerpo 30 del dispositivo está compuesto por un material flexible, impermeable al agua, no poroso, tal como polietileno u otras láminas poliméricas que tienen un grosor comprendido en un intervalo de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 5 mm, siendo más común de aproximadamente 0,2 mm a aproximadamente 2 mm. También pueden usarse otros espesores.

Las figuras 4 y 5 representan cortes del dispositivo 20, que muestran cómo el elemento 40 polimérico adsorbente de gran área superficial está fijado o unido de otra manera por medio de una tira 48 polimérica alargada a las paredes laterales opuestas de la bolsa 20.

Fabricación del dispositivo de preparación de muestras

El material puede estar compuesto por un material de una sola capa o puede comprender dos o más capas que están selladas entre sí o separadas para formar un contenedor de doble pared. Cuando las capas están selladas entre sí, el material puede comprender un material laminado o extruido. El material laminado comprende dos o más capas formadas por separado que posteriormente son aseguradas entre sí mediante un adhesivo.

El material extruido puede comprender una única lámina integral que comprende dos o más capas de material diferente separadas por una capa de contacto que son coextruidas todas ellas simultáneamente.

En una realización, el cuerpo 30 comprende una bolsa bidimensional en forma de almohada en la que dos láminas de material se colocan en una relación superpuesta y las dos láminas se unen entre sí en sus periferias para formar un compartimento 32 interno. Alternativamente, una sola hoja de material puede ser plegada y cosida alrededor de la periferia para formar el compartimento 32 interno.

Aunque el cuerpo 30 se representa en las Figuras 1-6 con una configuración bidimensional sustancialmente en forma de almohada, se aprecia que el cuerpo 30 puede fabricarse de manera que tenga prácticamente cualquier tamaño, forma y configuración deseados.

Por ejemplo, el cuerpo 30 puede formarse de manera que tenga un compartimento 32 interno dimensionado para contener 100 ml, 500 ml, 1 litro, 10 litros, u otras cantidades deseadas. Sin embargo, en cualquier realización, es deseable que el cuerpo 30 sea recibido en un soporte opcional (no mostrado), proporcionando al menos un soporte generalmente uniforme del cuerpo 30 para impedir un fallo del cuerpo 30 por las fuerzas hidráulicas aplicadas al cuerpo cuando se llena con una muestra líquida que contiene las biomoléculas de interés.

Un cuerpo tridimensional (no mostrado) comprende una pluralidad, es decir, típicamente tres o más, paneles discretos. El cuerpo está compuesto por cuatro paneles, es decir, un panel superior, un panel frontal, un panel posterior y un panel inferior. (no mostrado) Cada panel tiene preferiblemente una parte central sustancialmente cuadrada o rectangular. El panel superior y el panel inferior incluyen una primera parte de extremo y una segunda parte de extremo opuesta que sobresalen desde los extremos opuestos de la parte central. Cada una de las partes de extremo tiene

una configuración sustancialmente trapezoidal con bordes cónicos opuestos. Cada uno de entre el panel frontal y el panel posterior incluye una primera parte de extremo triangular y una segunda parte de extremo triangular opuesta que sobresale desde los extremos opuestos de la parte central. (no mostrado)

5 Los bordes perimetrales correspondientes de cada panel se unen entre sí para formar un cuerpo sustancialmente en forma de caja. (no mostrado) Los paneles se unen entre sí mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como las energías térmicas, las energías de RF, las energías de sonido, otras energías de sellado, los adhesivos u otros procedimientos convencionales. Se aprecia que, al alterar el tamaño y la configuración de algunos o todos los paneles, el cuerpo puede formarse de maneja que tenga una diversidad de tamaños y configuraciones diferentes. También se aprecia que pueden usarse cualquier número de paneles para ajustar el tamaño y la configuración del cuerpo.

En otra realización más, una longitud de tubo puede colocarse plana para formar dos bordes plegados opuestos. A continuación, los dos bordes plegados se invierten hacia adentro para formar un pliegue en cada lado. A continuación, el extremo opuesto del tubo se cierra con una costura. Finalmente, se forma una costura en ángulo en cada esquina para formar una bolsa tridimensional cuando se infla.

15 Se aprecia que las técnicas anteriores pueden mezclarse y combinarse con una o más láminas poliméricas y que todavía hay una diversidad de otras formas en las que puede formarse un cuerpo con una configuración bidimensional o tridimensional.

A continuación, los tubos y/o los contenedores se acoplan (no se muestra) a al menos uno de los puertos 52 y 54 para entregar una solución y eliminar la solución al compartimento 32 interno del conjunto 20 de bolsa de preparación de muestras.

Las Figuras 1-6 muestran ejemplos del número y de la naturaleza de los puertos que puede tener la bolsa. Un experto en la técnica conocerá los requisitos para un cultivo celular particular y podría proporcionar fácilmente los puertos necesarios para una aplicación particular.

Sistemas de cromatografía

25 En algunas realizaciones, la invención proporciona un sistema para aislar, a partir de muestras líquidas y/o alimentaciones, biomoléculas de interés cuando la muestra entra en contacto con la cortina de adsorción de fibras conformadas funcionalizadas. Las muestras líquidas incluyen alimentos líquidos no clarificados y muestras que contienen una o más biomoléculas de interés, incluyendo células, células madre, anticuerpos monoclonales (mAbs), proteínas, anticuerpos, péptidos, oligopéptidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, ARN, ADN, oligosacáridos y polisacáridos.

En algunas realizaciones, la invención proporciona que el sistema incluya el dispositivo, una carcasa adecuada para sostener el dispositivo, una o más bombas y/o dispositivos de compresión para facilitar el flujo de la mezcla hacia y desde el dispositivo.

Las bombas adecuadas incluyen bombas peristálticas, bombas de impulsos y/o bombas de desplazamiento positivo.

35 El sistema puede incluir uno o más medios para detectar el contenido de un eluyente desde la cortina de adsorción de fibras conformadas funcionalizadas. El detector puede ser un detector basado en la luz que se basa en la detección de longitud de onda múltiple o en la detección de longitud de onda única. Los detectores adecuados incluyen un espectrofotómetro capaz de detectar longitudes de onda visibles de la luz, una absorción de UV en el detector, un detector de fluorescencia. El detector puede ser un detector de dispersión de luz que se basa en fuentes de láser o un detector electroquímico que responde a sustancias oxidables o reducibles y la salida eléctrica es un flujo de electrones generado por una reacción que tiene lugar en la superficie de los electrodos.

40 El sistema también puede incluir una o más impresoras para proporcionar cromatogramas del material eluido desde los medios de cromatografía. El sistema también puede incluir uno o más ordenadores personales. El ordenador personal puede ser adecuado para registrar datos, tales como la absorbancia o la fluorescencia de una fracción de elución. Además, el ordenador puede estar equipado con un software adecuado para calcular la concentración de una molécula objetivo en una fracción de elución.

Procedimiento de uso

50 En ciertas realizaciones, la invención proporciona dispositivos, y procedimientos de uso y procedimientos para fabricar los dispositivos, en los que una vez que las fibras conformadas funcionales han adsorbido las especies de interés, el fluido que incluye los sólidos restantes se vacía desde los dispositivos.

La invención se puede usar para filtrar, separar, preparar, identificar, enriquecer, detectar, aluir, unir y/o purificar analitos, biomoléculas, proteínas, mAbs, etc. de interés desde muestras líquidas y alimentaciones usando la estructura polimérica adsorbente de tipo cortina de una o más fibras conformadas funcionalizadas para unir/capturar las especies de interés, bien las biomoléculas de interés o bien partículas contaminantes que se desean eliminar (es decir, especies

no deseadas) encontradas en la muestra líquida.

Las aplicaciones alternativas para el dispositivo incluyen la eliminación de especies no deseadas desde un fluido mientras se mantienen los sólidos como el producto (por ejemplo, purificación de células madre) a ser recogido en el permeado.

5 La Figura 6 muestra esquemáticamente una cierta realización para el uso del dispositivo 20.

El dispositivo 20 es cargado con una alimentación cruda no clarificada que contiene un poco menos de proteína, a continuación, se usa la capacidad de las fibras para la unión.

Enjuague/Lavado: Después de agitar el dispositivo 20 que contiene la muestra líquida (véase la Figura 3 que representa una bolsa 20 cargada) durante cierto período de residencia, el dispositivo se vació.

10 Los posibles procedimientos para vaciar la bolsa 20 incluyen el uso de la gravedad, una bomba, vacío, compresión mecánica, etc., para vaciar el dispositivo de manera eficiente y, por lo tanto, para minimizar el desperdicio y maximizar la recuperación del producto de alta concentración.

15 En cada etapa en la que el dispositivo 20 se vacía, la eficiencia máxima de la eliminación de fluido se consigue mediante vacío u otros procedimientos para comprimir el lecho de fibras conformadas. La configuración paralela también ayuda a permitir una alta compresión del lecho con una fuerza mínima que resulta en un vaciado eficiente y una operación práctica.

20 De las muchas formas posibles de activar la compresión del dispositivo, un procedimiento que funcione desde un extremo hacia el puerto de salida mantendría el lecho de fibras mínimamente comprimido durante la mayor parte del flujo. Por ejemplo, la bolsa podría enrollarse alrededor de un núcleo giratorio con un rodillo de presión. (no mostrado) Elución A la bolsa vacía del dispositivo 20, añadir tampón de elución (lo suficiente como para humedecer completamente). Eliminar el fluido saturado del producto y repita varias veces para alcanzar el % de recuperación objetivo sin diluir en exceso el producto.

25 Usando vacío, se consiguió un residuo de 2 ml de líquido/g de fibra. Las etapas de enjuague y elución subsiguientes funcionan con etapas de ciclo similares. En la práctica, para la eliminación de sólidos, el residuo efectivo es de aproximadamente 10 ml de líquido/g de fibra.

Una vez retirada la muestra líquida de la bolsa 20 de preparación, la bolsa de preparación de muestras puede simplemente desecharse o reciclarse. A continuación, se utiliza una nueva bolsa 20 de preparación de muestras para un nuevo lote de muestras líquidas. Como resultado, no se requiere una limpieza del tanque o del mezclador entre diferentes lotes y el riesgo de contaminación cruzada es bajo.

30 En ciertas realizaciones, la invención incluye una pantalla contra el lecho de fibra que mueve el flujo de líquido fuera del lecho de fibra. (no mostrado)

Ejemplo

Ejemplo 1

Eliminación de sólidos usando el dispositivo 20

35 Se realizó un experimento para demostrar la eliminación de sólidos, tales como células/residuos, desde una muestra líquida usando ciertas realizaciones de la presente invención.

La cosecha del cultivo celular no modificado se cargó en el dispositivo 20 a 100 ml/g de fibra y posteriormente se realizó un ciclo con tampón PBS para representar las etapas de lavado y elución.

40 La turbidez se controló en cada etapa, siendo 10 NTU un desafío razonable para un filtro de membrana de grado de esterilización antes de enviar el producto aguas abajo para una purificación adicional.

Mediante la construcción de una curva de calibración para la turbidez frente a la dilución, se calculó que se eliminó el 99,5% de los sólidos en masa antes de la filtración estéril. (Véase la Figura 7) Separación de proteínas usando el dispositivo 20 (Véase las Figuras 8A y 8B)

45 Usando los mismos volúmenes de tampón, se realizó una separación de proteínas de MES 20 mM + NaCl 0,1M pH 6, enriquecido con 0,17 mg/ml de mAb04 y 1 mg/ml de BSA.

El mismo tampón sin proteína se usó para el lavado. El tampón de elución fue MES 20 mM + NaCl 0,5 M, pH 6. (Véase la Figura 9) Rendimiento: > 90% del mAb unido Líquido residual (mAb) recuperado que queda en el dispositivo = 1% Pureza 3,7% de BSA original (0,09 mg/ml) en el grupo de elución (LRV = 1,2) factor de purificación = 5

Kits

- Se describen kits, que pueden usarse para aislar, capturar, purificar o si no tratar analitos de biomoléculas de interés a partir de una muestra líquida. El kit puede comprender, por ejemplo, una o más bolsas que tienen la estructura polimérica adsorbente de tipo cortina de una o más fibras conformadas en la misma según la presente invención y uno o más soportes. El kit puede contener uno o más controles o analitos de muestras de interés y puede incluir opcionalmente varios tampones útiles en los procedimientos de la invención. Como ejemplo, el kit puede incluir tampones, opcionalmente, pueden incluirse en el kit tampones de lavado para eliminar reactivos o material unido o retenido no específicamente. Otros reactivos de kit opcionales incluyen un tampón de elución para eluir un ácido nucleico diana unido a partir de la estructura polimérica adsorbente de tipo cortina de una o más fibras conformadas.
- 5
- 10 Cada uno de los tampones puede proporcionarse en un contenedor separado como una solución. Alternativamente, las mantequillas pueden proporcionarse en forma seca o en polvo y pueden prepararse como una solución según la aplicación deseada por el usuario. En este caso, los tampones pueden proporcionarse en paquetes. El kit puede proporcionar una fuente de alimentación en los casos en que el dispositivo está automatizado, así como un medio para proporcionar una fuerza externa, tal como una bomba de vacío, dispositivos de compresión y similares. El kit también puede incluir instrucciones de uso del dispositivo y/o de carga de la estructura polimérica adsorbente de tipo cortina de una o más fibras conformadas y/o de preparación de reactivos adecuados para su uso con el dispositivo y procedimientos según la presente invención. También puede incluirse un software opcional para registrar y analizar los datos obtenidos al practicar los procedimientos de la invención o al usar el dispositivo de la invención.
- 15
- 20 El término "kit" incluye, por ejemplo, cada uno de los componentes combinados en un solo paquete, los componentes empaquetados individualmente y vendidos juntos, o los componentes presentados juntos en un catálogo (por ejemplo, en la misma página o en el pliego de dos páginas del catálogo).
- La invención se aclarará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que pretenden ser ejemplos de la invención.
- Habiendo descrito en detalle las realizaciones preferidas de la presente invención, ahora será evidente para los expertos en la materia que pueden realizarse numerosas modificaciones en las mismas sin apartarse del alcance de la invención, tal como se define en las siguientes reivindicaciones.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (20) de preparación de muestras líquidas, flexible, desechable, que comprende:
- 5 un cuerpo (30) plegable que tiene un compartimiento (32) interno definido por paredes (34) laterales, una superficie (36) interior, una superficie (38) exterior, una entrada (52), una salida (54) y un elemento (40) polimérico adsorbente de alta área superficial contenido dentro del compartimiento (32) interno, en el que el elemento (40) polimérico adsorbente tiene un primer extremo (42) y un segundo extremo (44), **caracterizado porque** el primer extremo (42) y el segundo extremo (44) están unidos a la superficie (36) interior de las paredes (34) laterales opuestas mediante tiras (46), (48) poliméricas alargadas.
- 10 2. Dispositivo (20) según la reivindicación 1, en el que el cuerpo (30) es una bolsa bidimensional en forma de almohada.
3. Dispositivo (20) según la reivindicación 1, en el que el elemento (40) polimérico adsorbente incluye una estructura de tipo cortina de un lecho de fibra conformadas poliméricas.
4. Dispositivo (20) según la reivindicación 3, en el que el lecho de fibras conformadas poliméricas incluye una fibra de monofilamento conformada polimérica continua.
- 15 5. Dispositivo (20) según la reivindicación 3, en el que la fibra conformada comprende además grupos funcionales colgantes de superficie que proporcionan funcionalidad de intercambio catiónico o intercambio aniónico.
6. Dispositivo (20) según la reivindicación 3, en el que la fibra conformada tiene una sección transversal en forma de alas con una región media que comprende un eje longitudinal que se extiende hacia abajo desde el centro de la fibra y que tiene múltiples proyecciones que se extienden radialmente hacia fuera desde la región media.
- 20 7. Dispositivo (20) según la reivindicación 3, en el que la fibra conformada comprende poliolefinas, polímeros termoplásticos, polipropileno, poliéster, polietileno, poliamida, copoliésteres, polímeros cristalinos líquidos y elastómeros termoplásticos, elastómeros de poluretano termoplásticos basados en poliéteres, poliéter ésteres y PBAX y olefinas elastoméricas.
- 25 8. Dispositivo (20) según la reivindicación 3, en el que la fibra conformada se ensambla en bucles sustancialmente paralelos entre sí.
9. Procedimiento de elaboración de un dispositivo (20) de preparación de muestras líquidas en forma de almohada, flexible, desechable, según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el procedimiento comprende:
- 30 a. proporcionar una única lámina polimérica que tiene una periferia exterior;
- b. proporcionar un elemento (40) polimérico adsorbente unido a al menos un elemento (46, 48) de unión polimérico adsorbente, en el que el elemento (46, 48) de unión tiene extremos primero y segundo;
- c. colocar el elemento (40) polimérico adsorbente y el elemento (46, 48) de unión en la lámina polimérica;
- 35 d. plegar la lámina polimérica de manera que la periferia externa de la superposición de la lámina y los extremos primero y segundo del elemento (46, 48) de unión estén intercalados entre las periferias externas superpuestas opuestas;
- e. unir la lámina polimérica en la periferia exterior superpuesta y los extremos primero y segundo del elemento (46, 48) de unión;
- 40 f. formar un dispositivo (20) con forma de almohada que tiene un compartimiento (32) interno para alojar el elemento (40) adsorbente unido de manera fija a las periferias exteriores opuestas de la lámina polimérica.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que una salida (54) y una entrada (52) están unidas fijamente al dispositivo (20) en forma de almohada.
- 45 11. Procedimiento de elaboración de una preparación (20) de muestra líquida en forma de almohada, flexible, desechable, según la reivindicación 1 en el que el procedimiento comprende:
- a. proporcionar dos láminas poliméricas, en el que cada lámina tiene una periferia exterior;
- b. proporcionar un elemento (40) polimérico adsorbente unido a al menos un elemento (46, 48) de unión polimérico adsorbente, en el que el elemento (46, 48) de unión tiene extremos primero y segundo;

- c. colocar el elemento (40) polimérico adsorbente y el elemento (46, 48) de unión entre las dos láminas poliméricas de manera que las periferias externas de las dos láminas se superpongan entre sí y los extremos primero y segundo del elemento (46, 48) de unión estén intercalados entre las periferias externas superpuestas opuestas;
- 5
- d. unir entre sí las dos láminas poliméricas en las periferias externas superpuestas y los extremos primero y segundo del elemento (46, 48) de unión formando un dispositivo (20) en forma de almohada que tiene un compartimiento (32) interno para alojar el elemento (40) polimérico adsorbente unido de manera fija a las periferias exteriores opuestas de las dos láminas poliméricas.
- 10
- 12.** Procedimiento según la reivindicación 11, en el que una salida (54) y una entrada (52) están unidas fijamente al dispositivo (20) en forma de almohada.

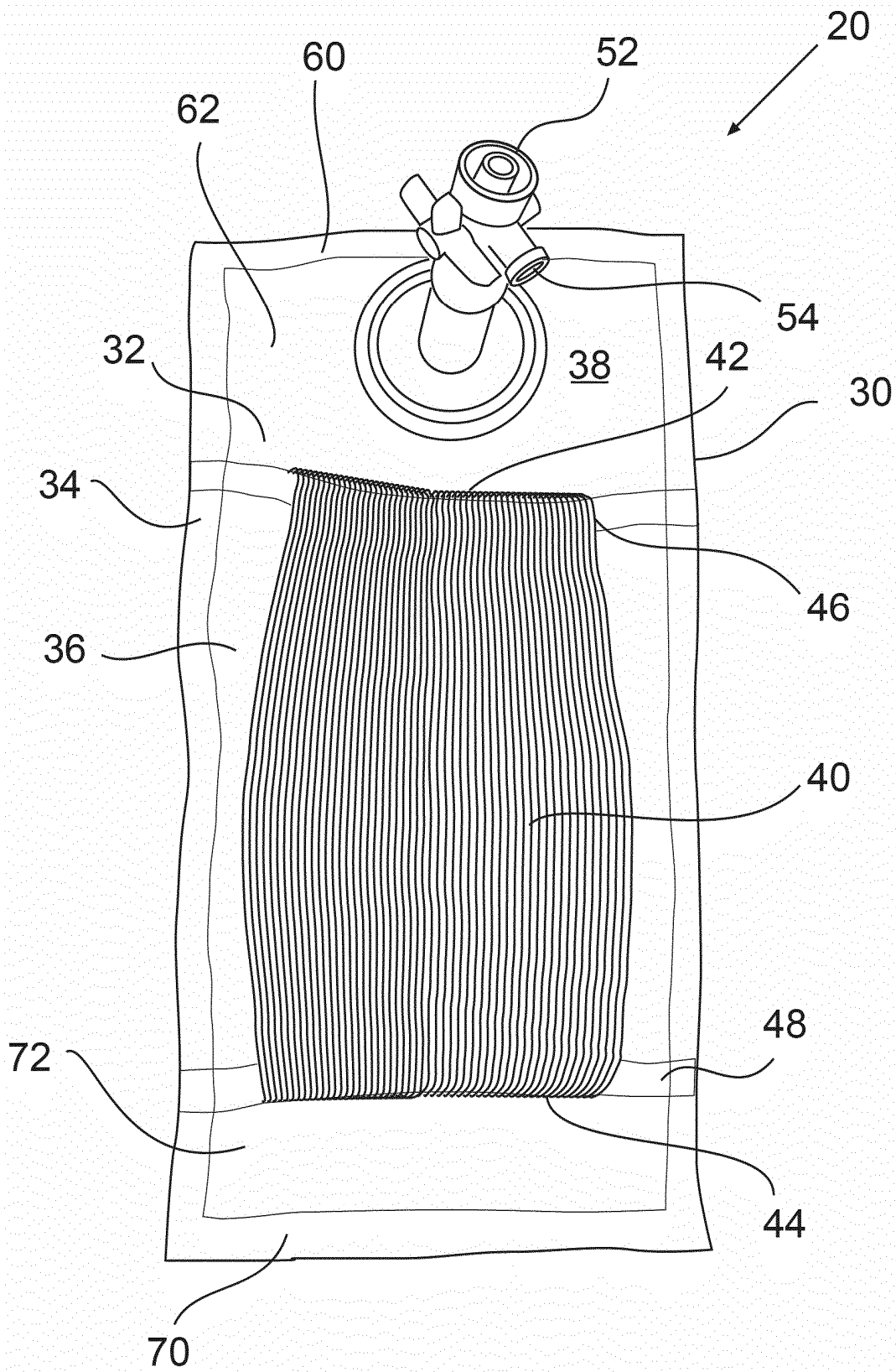


Figura 1

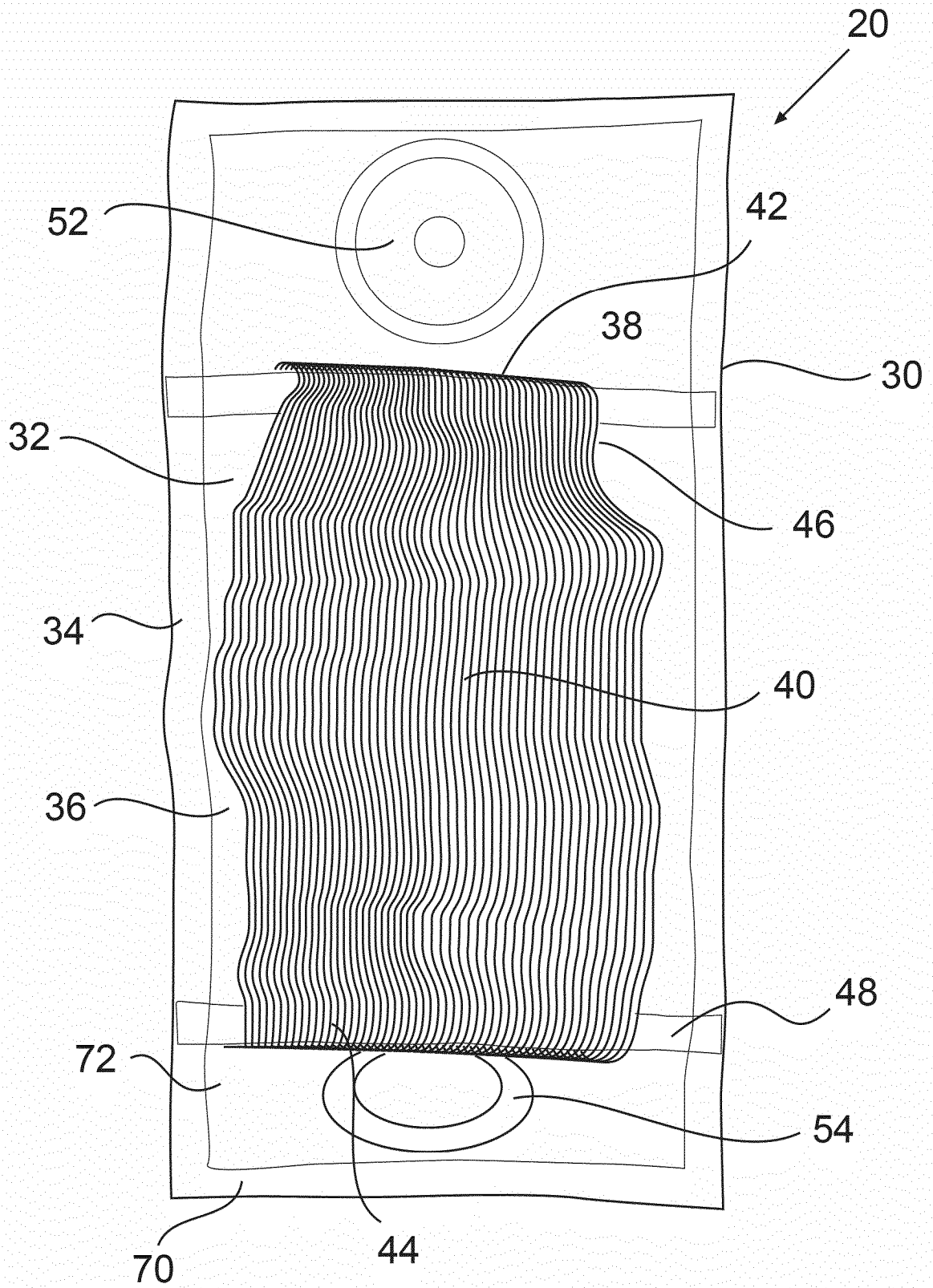


Figura 2

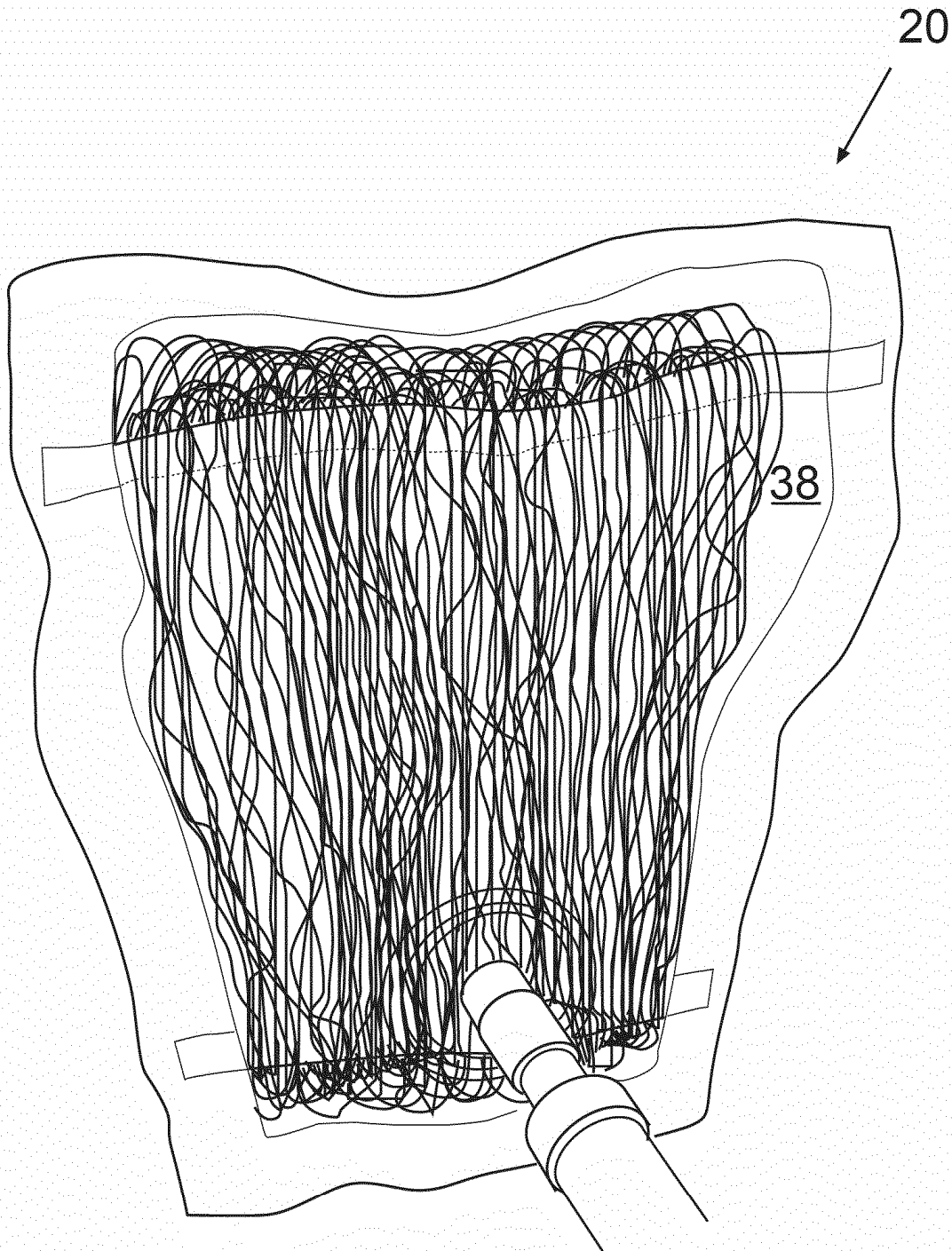


Figura 3

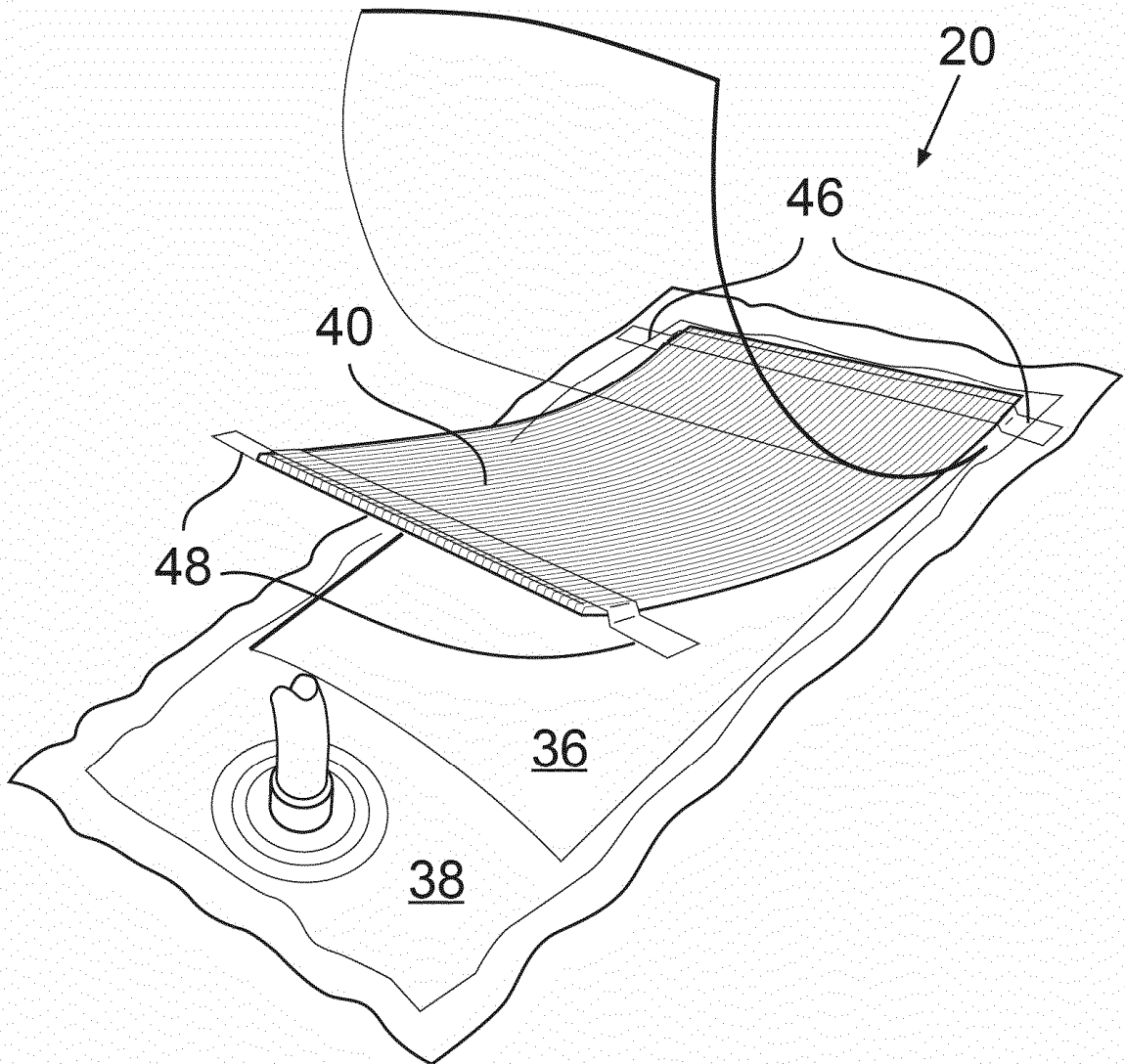


Figura 4

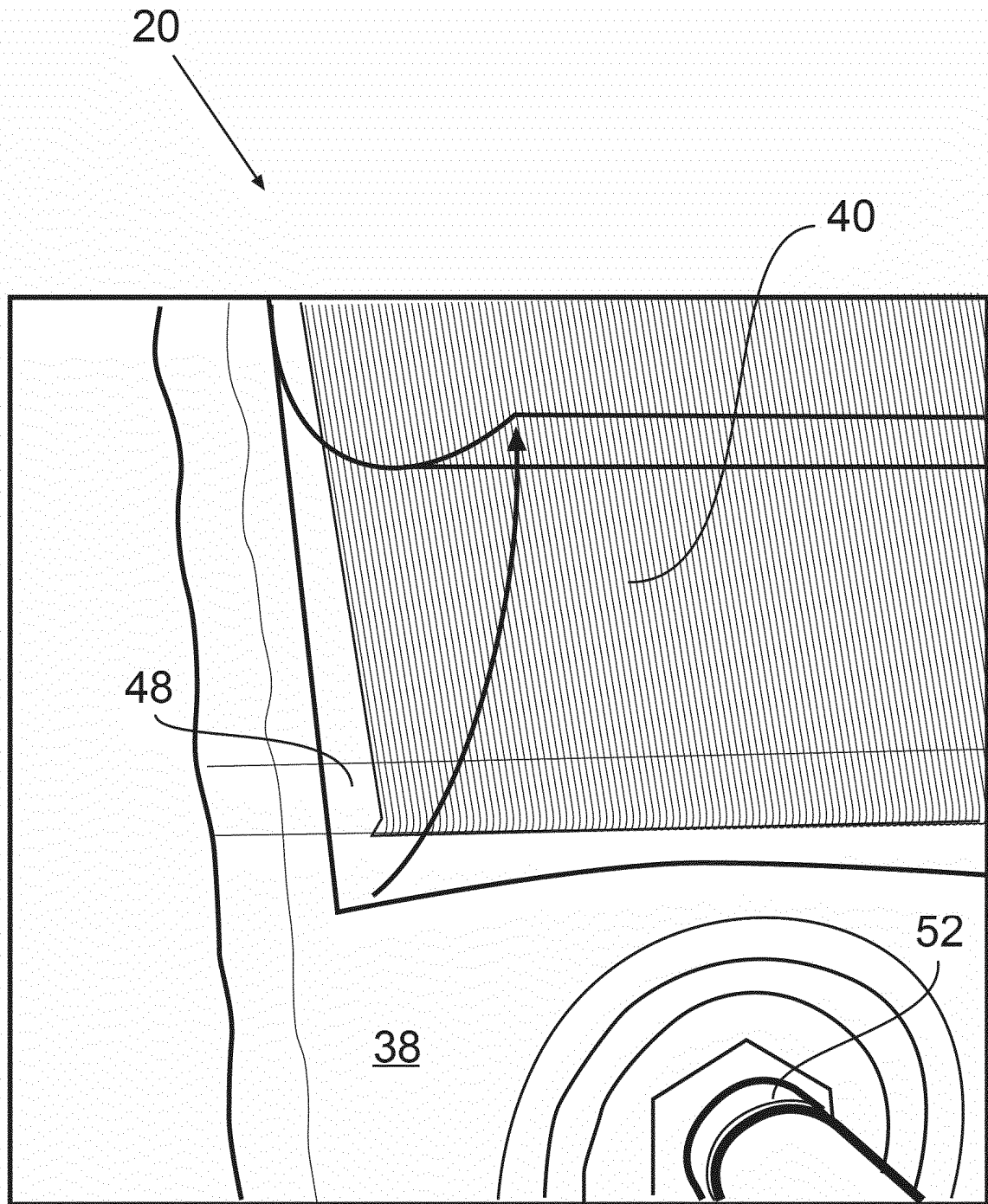


Figura 5

**Envase flexible de
fibras de
adsorción sueltas**

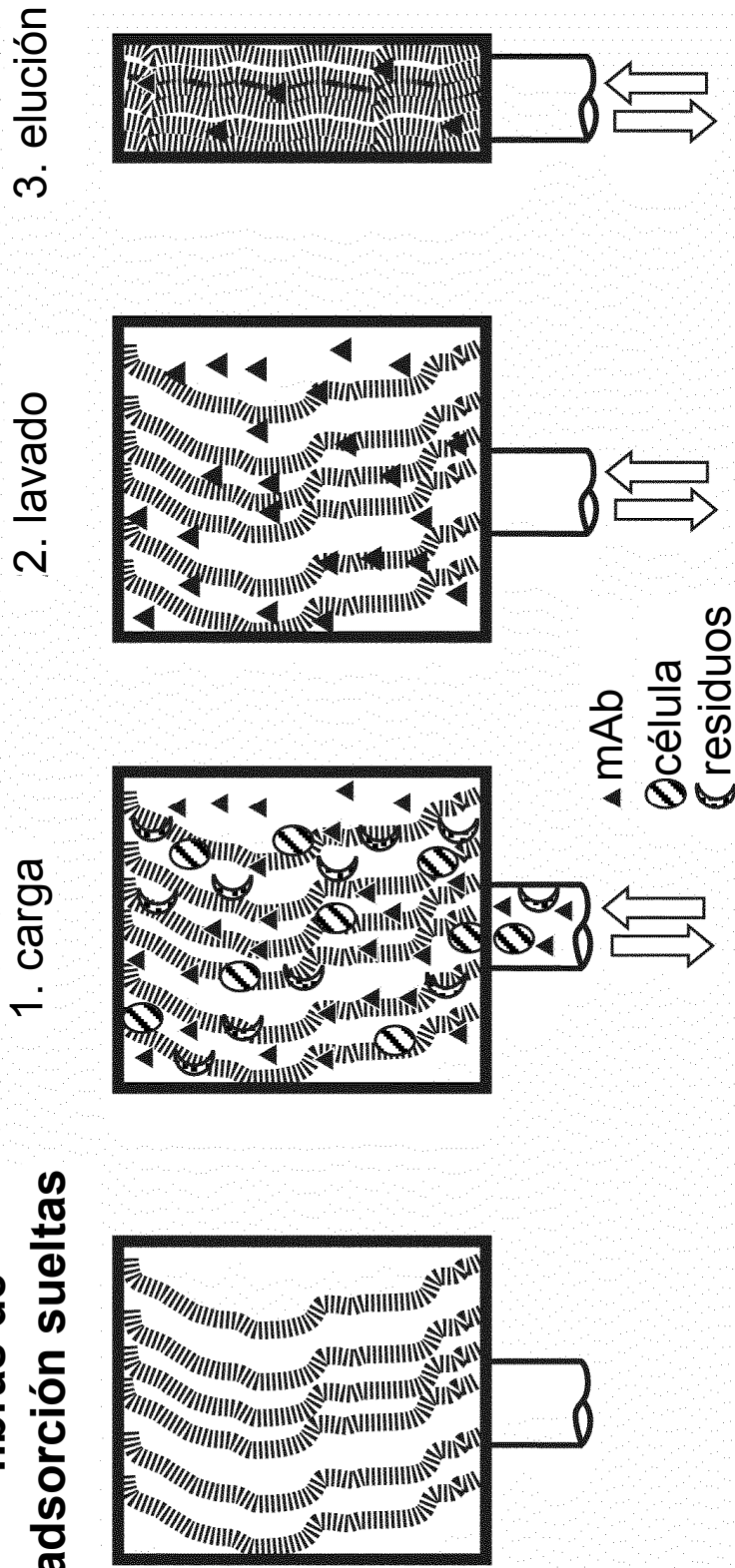


Figura 6

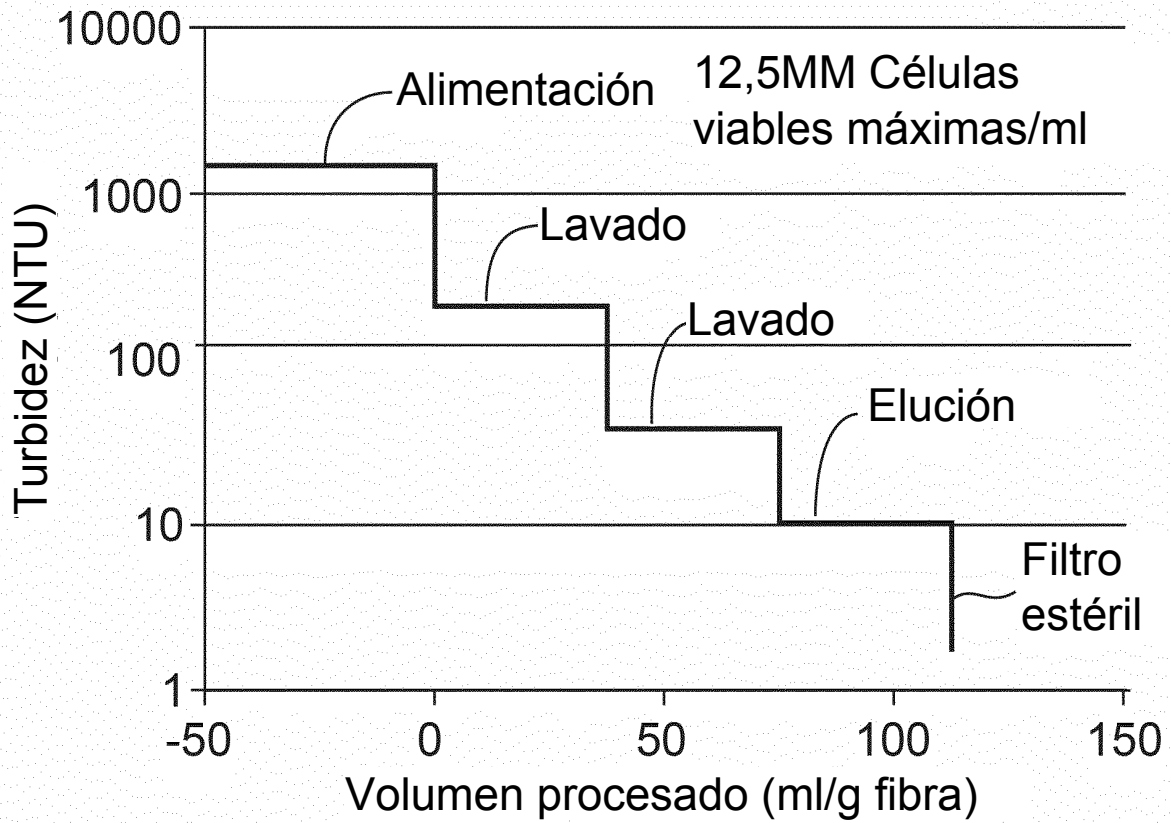


Figura 7

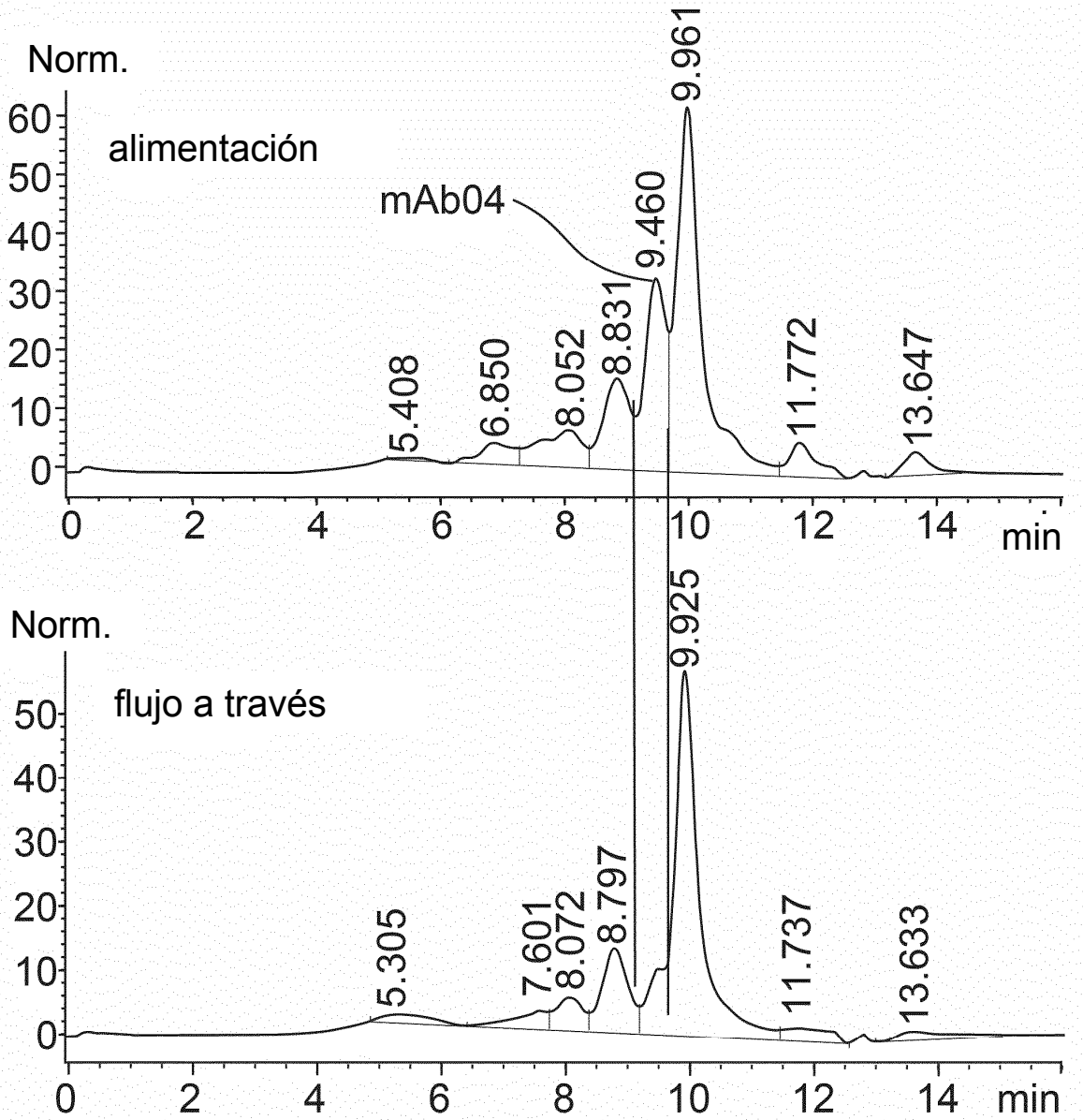


Figura 8A y B

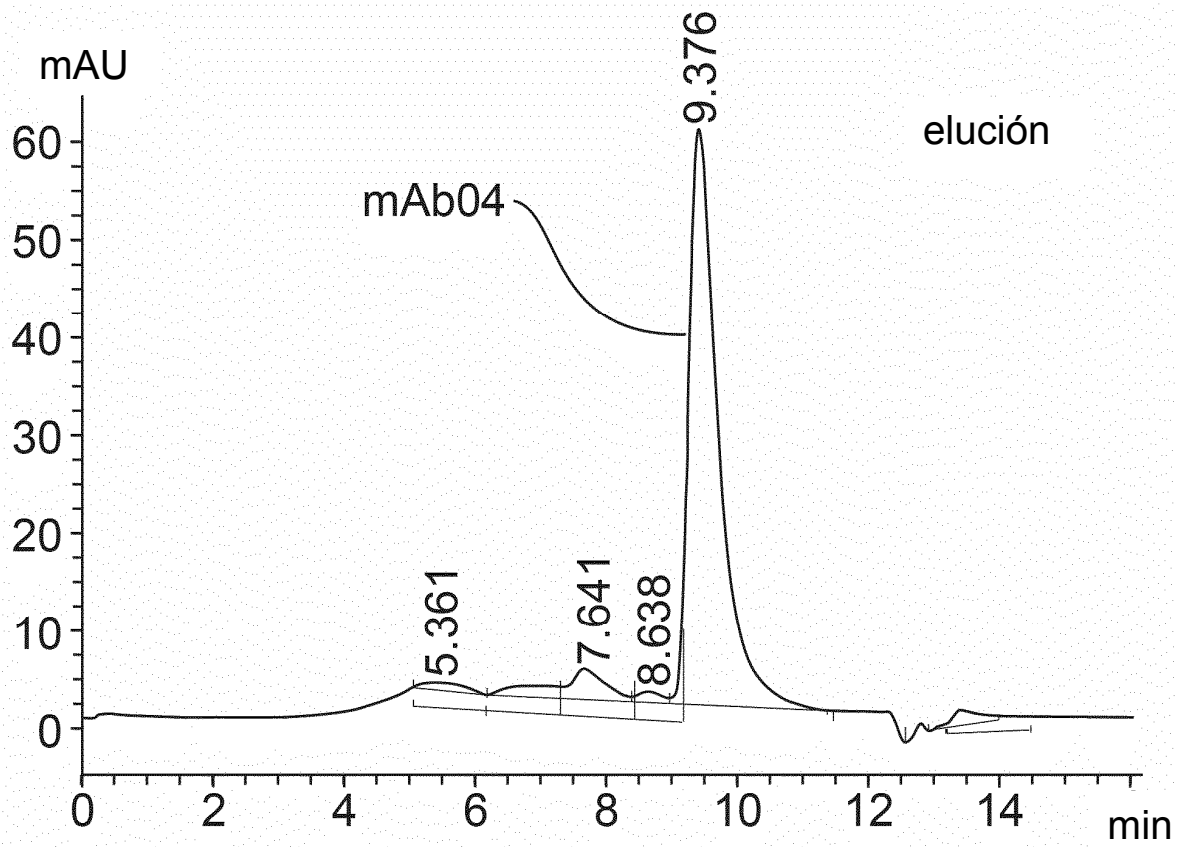


Figura 9