

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 232**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/00**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2009 PCT/US2009/067097**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010 WO10074953**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2009 E 09835506 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2370561**

54 Título: **Reactor de tanque agitado y procedimiento**

30 Prioridad:

**16.12.2008 US 201865 P**

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

**19.03.2020**

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)  
290 Concord Road  
Billerica, MA 01821, US**

72 Inventor/es:

**MOYA, WILSON y  
DUPONT, ALISON**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 749 232 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

Reactor de tanque agitado y procedimiento

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a recipientes de tanque agitados, y a procedimientos relacionados.

5 **Antecedentes de la invención**

El proceso general de fabricación de biomoléculas, por ejemplo proteínas, en particular de proteínas recombinantes, normalmente consta de dos etapas principales (1) la expresión de la proteína en una célula anfitriona, seguido por (2) la purificación de la proteína. La primera etapa conlleva el crecimiento de la célula anfitriona deseada en un biorreactor para efectuar la expresión de la proteína. Algunos ejemplos de estirpes celulares utilizadas con este fin incluyen las células de o varios hamsters chinos, células bacterianas de mieloma (NSO) por ejemplo células de e-coli e insectos. Una vez que la proteína es expresada en los niveles deseados, la proteína es retirada de la célula anfitriona y recogida. Los particulados suspendidos, por ejemplo células, fragmentos de células, lípidos y otras materias insolubles son normalmente retirados del fluido que contiene proteínas mediante filtración y centrifugación, terminando en un fluido clarificado que contiene la proteína de interés en disolución así como otras impurezas disolubles.

La segunda etapa conlleva la purificación de la proteína recogida para eliminar las impurezas inherentes al proceso. Ejemplos de impurezas incluyen proteínas de células anfitrion (HCP), proteínas distintas de la deseada o de la proteína diana, ácidos nucleicos, endotoxinas, virus, variantes de proteínas y agregados de proteínas. La purificación típicamente conlleva diversas etapas cromatográficas, las cuales incluyen cromatografía de afinidad, intercambio de iones, interacción hidrofóbica, etc. sobre matrices sólidas, por ejemplo agarosa porosa, sustancias poliméricas o vidrio o mediante adsorbentes con base en una membrana.

Un ejemplo de una cadena de procesos cromatográficos para la purificación de proteínas conlleva la afinidad de la proteína - A seguida por un intercambio de cationes, seguida por un intercambio de aniones. La columna de la proteína - A captura la proteína de interés o la proteína diana mediante un mecanismo de afinidad mientras el grueso de las impurezas pasa a través de la columna que debe ser desechada. La proteína a continuación es recuperada por elución de la columna. Dado que la mayoría de las proteínas de interés presentan unos puntos isoeléctricos (PI) en la amplitud básica (8 - 9) y, por tanto, que resultan positivamente cargadas en condiciones de tratamiento normales (pH por debajo de los PI de la proteína), están ligadas a la resina de intercambio de cationes en la segunda columna. Otras impurezas positivamente cargadas también quedan unidas a esta resina. La proteína de interés es entonces recuperada por elución a partir de esta columna bajo determinadas condiciones (pH, concentración salina) en las que la proteína se eluye mientras las impurezas permanecen unidas a la resina. La columna del intercambio de aniones típicamente operada en un modo de flujo pasante, de manera que cualquier impureza cargada negativamente queda unida a la resina mientras que la proteína de interés cargada positivamente se recupera en el vapor del flujo pasante. El proceso se traduce en una disolución de proteína concentrada y altamente purificada.

En los últimos años se han investigado otros procedimientos alternativos para purificar las proteínas. Uno de dichos procedimientos conlleva una técnica de floculación. En esta técnica, un polielectrólito soluble es añadido a un cultivo de células no clarificadas para capturar las partículas suspendidas en una porción de las impurezas disolubles formando así un floculante, el cual es a continuación retirado de la disolución de proteína mediante filtración o centrifugación.

Como alternativa, un polielectrólito soluble es añadido al caldo de cultivo de las células clarificadas para capturar las biomoléculas de interés, formando con ello un floculante, el cual se deja asentar y puede ser a continuación aislado del resto de la disolución. El floculante es típicamente lavado para retirar las impurezas adheridas sin fijeza. A continuación, un incremento de la resistencia iónica de la disolución lleva consigo la disociación de la proteína diana a partir del polielectrólito, lo que se traduce a continuación en la redisolubilización del polielectrólito en la disolución con contenido en proteínas.

En una solicitud estadounidense con el número de serie 12/004,314 depositada el 20 de diciembre de 2007, pendiente con la actual, un polímero, soluble bajo determinadas condiciones, por ejemplo la temperatura, el pH, la sal, la luz y combinaciones de estas, es utilizado para ligar las impurezas mientras se encuentran en su estado soluble y a continuación, es precipitado tras una modificación de las condiciones (pH o la temperatura, etc.) eliminando las impurezas con ello. La biomolécula de interés es a continuación tratada de nuevo utilizando una cromatografía tradicional o unos adsorbentes de membrana y procedimientos similares.

Todas las tecnologías de purificación de las proteínas analizadas anteriormente comparten un fondo común, a saber, primero eliminar los particulados suspendidos en una primera etapa diferenciada y, a continuación, en una segunda etapa, separar las biomoléculas de interés de las impurezas disolubles que sean inherentes al proceso.

La recuperación del producto *in situ* con partículas magnéticas derivadas es un ejemplo de una técnica de purificación de proteínas en la que las biomoléculas de interés pueden ser purificadas directamente a partir de un caldo de cultivo de células no purificadas. En esta técnica, una cubierta polimérica que encapsula una bioesfera magnética es funcionalizada con un ligante de afinidad que busca y une la proteína diana. Un campo magnético es entonces aplicado para recoger los complejos de microesferas - proteínas dejando detrás las impurezas solubles y los particulados insolubles.

El inconveniente principal de esta técnica es que requiere unas inversiones de capital apreciables en el diseño, construcción y homologación de los separadores magnéticos de elevado gradiente. Así mismo, las técnicas no se prestan a aplicaciones desechables, las cuales son evaluadas para constituir la norma de la purificación de las proteínas en la industria del Bioprocesos.

En la solicitud depositada el 16 de diciembre de 2008 con el número de expediente procesal MCA 1046, pendiente con la actual, con el título "Purificación de Proteínas" de Moya, Wilson, et al., se divulga un polímero, por ejemplo un polímero soluble capaz de unirse sustancialmente de manera irreversible con unos particulados insolubles y a un subconjunto de impurezas solubles y también es capaz de su unión de manera reversible a una o más de las biomoléculas deseadas en un material biológico no clarificado que contenga vapor y los procedimientos de utilización de dicho material para purificar una o más biomoléculas deseadas de un flujo sin la necesidad de una clarificación previa. Más concretamente, esta solicitud pendiente con la actual divulga un polímero sensible a estímulos, por ejemplo un polímero selectivamente soluble capaz de su enlace selectivo y reversible con una o más biomoléculas deseadas en un flujo de contenido de material biológico no clarificado y a los procedimientos de utilización de dicho polímero para purificar una o más biomoléculas deseadas de dicha mezcla de materiales complejos que incluyen la(s) biomolécula(s) de interés y diversas impurezas, por ejemplo otras proteínas (proteínas de células anfitrión), ADN, virus, células enteras, residuos celulares y similares, sin necesidad de clarificación previa del flujo.

El polímero es soluble bajo un determinado conjunto de condiciones del proceso, por ejemplo una o más condiciones entre el pH, concentración salina, temperatura, luz o el campo eléctrico, y es susceptible de interactuar y ligar con impurezas insolubles (células, residuos, etc.) y con una fracción de las puras solubles, convirtiéndose en insoluble y precipita la solución tras un cambio de las condiciones (temperatura, concentración salina, luz, campo eléctrico o pH), por ejemplo un polímero sensible a estímulos. Únicamente cuando se precipita como una disolución, el polímero es capaz de unirse de manera reversible a una o más biomoléculas deseadas dentro del flujo (proteína, polipéptido, etc.) en un caldo de cultivo no clarificado. El precipitado puede entonces ser retirado del flujo, por ejemplo mediante filtrado de la filtración respecto del resto del flujo y la biomolécula deseada es recuperada por ejemplo mediante una elución selectiva del precipitado.

La retirada del precipitado, sin embargo, puede ser problemática, en cuanto se presenta normalmente bajo la forma de una gran masa de sedimentos.

El documento WO 96/37600 A1 describe un dispositivo de filtrado para el tratamiento y el cultivo de una muestra, en el que dicho dispositivo comprende una única membrana de filtrado.

El documento US 2008/255027 A1 describe un proceso de purificación de una biomolécula mediante la precipitación de la biomolécula con un polímero y, a continuación, la recuperación de la biomolécula utilizando una etapa de filtrado. Sería conveniente disponer de un aparato y un procedimiento para la purificación eficaz de muestras, en particular de las que contienen biomoléculas, de modo preferente dentro de un único aparato integral, que redujera o eliminara una o más etapas del proceso que pudieran traducirse en contaminación o pérdida de material.

### **Sumario de la invención**

En un aspecto, la invención provee un montaje para el cultivo o el tratamiento de una muestra de flujo que comprende un primer recipiente (22) que presenta un espacio interior, una primera base (100) fijada de manera estanca a dicho primer recipiente (22) y al menos una membrana (110) fijada herméticamente sobre dicha base (100) para el filtrado de dicha muestra de fluido; una salida (32b) en dicha base (100) para la muestra de fluido filtrada, un segundo recipiente (22') en comunicación de fluido con la salida (32b) de dicha primera base (100), en el que dicho segundo recipiente (22') queda fijado de manera estanca a dicha segunda base (100') comprendiendo dicha segunda base (100') una membrana (110') y una superficie de soporte que comprende unos surcos para el flujo de fluido. En determinadas formas de realización, dicho segundo recipiente (22') soporta al menos una membrana (110'). En determinadas formas de realización, el primer recipiente (22) es un biorreactor. En determinadas formas de realización, el montaje comprende además un agitador situado dentro del cuerpo de dicho primer recipiente (22) para agitar dicha muestra. En determinadas formas de realización, dicha primera base (100) comprende una superficie (101) de soporte formada con unos surcos (102) para el flujo de fluido, estando dichos surcos (102) en comunicación de fluido con una abertura (103) en dicha base, estando dicha abertura en comunicación de fluido con un orificio (32b) para drenar fluido a partir de la base (100). En determinadas formas de realización, dicha al menos una membrana (110) fijada herméticamente sobre dicha primera base (100) es una

membrana de de filtración grosera, y en el que dicha membrana (110') de dicha segunda base (100') es una membrana de calidad esterilizante de 0,2 micrómetros.

En otro aspecto, la invención provee un procedimiento de purificación de una biomolécula seleccionada entre el grupo compuesto por proteínas y anticuerpos a partir de una mezcla que contiene impurezas, que comprende:

- 5 (a) la provisión de un montaje que comprende la provisión de un primer recipiente (22) que presenta un espacio interior, una primera base (100) adaptada para ser fijada de manera estanca a dicho primer recipiente (22) y que soporta al menos una membrana (110) sellada con dicha primera base (100) para el filtrado de dicha mezcla; una salida (32b) dispuesta en dicha base (100), un segundo recipiente (22') en comunicación de fluido con la salida (32b) de dicha primera base (100) y una segunda base (100') fijada de  
10 manera estanca a dicho segundo recipiente (22'), comprendiendo dicha segunda base (100') una segunda membrana (110') y una superficie de soporte que comprende unos surcos para el flujo de fluido,
- (b) la provisión de la mezcla en un conjunto de condiciones,
- (c) la adición de uno o más polímeros, disolubles en dicha mezcla bajo el conjunto de condiciones y capaz de su enlace de manera reversible y selectiva con la biomolécula, en el que dichos uno o más polímeros se  
15 seleccionan entre el grupo compuesto por poli (N - vinylcaprolactamo), poli (N - acrilolpiperidina), poli (N - vinilisobutiramida), poli (N - isopropilacrilamida), poli (N, N' - dietilacrilamida), poli (N - acrilol - N - alquilpiperazina), hidroxialquilcelulosa, copolímeros de ácido acrílico y de ácido metacrílico, y polímeros y copolímeros de 2 - o 4 - vinilpiridina y quitosán ya sea con un ligando o con un grupo funcional fijado a él,
- (d) la mezcla de una o más polímeros solubilizados a través de la mezcla;
- (e) la precipitación en la solución, modificando el conjunto de la mezcla, los u no o más polímeros y la  
20 molécula unida;
- (f) el lavado de dicho precipitado mediante el contacto de dicho precipitado con una solución de lavado y el filtrado del sobrenadante a través de dicha primera membrana.
- (g) la recuperación de la biomolécula enlazada a partir del polímero y el filtrado de la biomolécula a través de  
25 dicha segunda membrana.

30 En determinadas formas de realización, dicho filtrado de dicho sobrenadante y dicho filtrado de dicha biomolécula son llevadas a cabo en el mismo aparato. En determinadas formas de realización, la biomolécula es un anticuerpo seleccionado entre el grupo compuesto por un anticuerpo recombinante, un anticuerpo monoclonal recombinante, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo humanizado y un fragmento de anticuerpo. En determinadas formas de  
35 realización, dicha biomolécula es una proteína.

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

- 40 La FIG. 1 es una vista en perspectiva de un biorreactor divulgado en la presente memoria;
- la FIG. 2 es una vista en sección transversal de una porción del biorreactor de la Figura 1;
- la FIG. 3 es una vista en perspectiva de una base de un biorreactor divulgado en la presente memoria;
- 45 la FIG. 4 es una vista en perspectiva de la base de la FIG. 3, que incluye una membrana herméticamente cerrada sobre ella;
- la FIG. 5 es una vista en perspectiva de un montaje de biorreactor, que incluye un alojamiento, una base del biorreactor y una base de filtrado;
- 50 la FIG. 6 es una vista en perspectiva de una base de filtrado de acuerdo con determinadas formas de realización; y
- la FIG. 7 es una vista en perspectiva de un agitador de acuerdo con determinadas formas de realización.

55 Solo las figuras 6 y 7 se corresponden a formas de realización y ejemplos de la invención.

#### **Descripción detallada**

60 Los recipientes o alojamientos pertinentes de utilidad en la presente memoria no están especialmente limitados. Con fines ilustrativos, se analizarán con detalle unos reactores y, en particular, unos biorreactores, entre los que se incluyen biorreactores desechables así como reutilizables. Por ejemplo, pueden ser utilizados los biorreactores resistentes a los disolventes que incorporen un cilindro de vidrio de porosilicato y componentes de PTFE, por

ejemplo los disponibles comercialmente en Millipore Corporation. De modo similar, pueden ser utilizados biorreactores desechables que utilicen bolsas, o que estén formados a partir de un plástico rígido o semirrígido. Dichos biorreactores desechables son generalmente preesterilizados. El medio de agitación dentro del biorreactor tampoco está particularmente limitado, e incluye una agitación a base de una hélice, agitadores magnéticos así como agitación inducida por ondas y una agitación inducida por burbujas de gas. La agitación es importante para impedir que los sólidos se asienten y obturen las una o más membranas utilizadas en la purificación.

La descripción que sigue hace referencia a un biorreactor. Los expertos en la materia apreciarán que ello dicha referencia tiene únicamente fines ilustrativos, y que las formas de realización divulgadas en la presente memoria son aplicables a cualquier recipiente de una muestra de líquido que presente o que forme en último término una muestra que presente un contenido en sólidos relativamente elevado.

Dirigiendo ahora la atención a las FIGS. 1 y 2, se muestra un biorreactor 2 sostenido por un pedestal 4, que se compone de varias patas 6 (en este ejemplo 3 patas aunque también pueden utilizarse una pata continua o 2 patas alargadas o más de 3 patas) y un reborde 8 de soporte. Como se muestra, las patas 6 pueden incorporar una pieza 10 de soporte opcional en o cerca del fondo para impedir que las patas 6 se abran cuando el biorreactor 2 es llenado y queda dispuesto en el pedestal 4.

Dependiendo del tipo de sistema de circulación o agitación utilizado, el pedestal 4 puede también soportar un mecanismo 12 de accionamiento (mostrado) para el mecanismo de circulación, consistente típicamente en un montaje de agitador o pala 14. En este ejemplo concreto, el mecanismo 12 de accionamiento es un motor y está montado en la parte superior del centro por encima de la parte superior 16 del biorreactor 2 mediante varios brazos 18 (aunque se muestran 3 pueden, como alternativa, utilizarse números diferentes). Pueden utilizarse otros elementos característicos, por ejemplo bloques de montaje (no mostrados), y similares, sobre la parte superior 16 o en el reborde 8 de soporte para soportar el mecanismo 12 de accionamiento. Como se muestra, el mecanismo 12 de accionamiento presenta un árbol 20 que puede ser fijado al agitador como se analiza más adelante en la presente memoria. Pueden utilizarse otros pedestales en lugar del diseño descrito con anterioridad que funcionarán de manera igualmente satisfactoria.

El cuerpo 22 del biorreactor (mostrado solo parcialmente en la FIG. 1) presenta un espacio interior dentro del cual están, al menos parcialmente, contenidos fluidos, células, sondas y otros dispositivos del biorreactor. El cuerpo 22 está fijado de manera estanca a la parte superior 16. Esta puede ser una junta estanca mecánica como por ejemplo una junta de caucho y unas placas soldadas 24 (como se muestra) o mediante una pinza de sujeción de banda o una pinza de sujeción Ladish o TriClover, unos filetes acoplados sobre la parte superior 16 y el cuerpo 22 y elementos similares. Como alternativa, el cuerpo 22 puede ser cerrado de forma estanca mediante adhesivos o por termosellado de la parte superior 16 con el cuerpo 22 o formados conjuntamente en una sola pieza como por ejemplo un aparato de rotomoldeo.

El cuerpo 22 presenta una o más paredes laterales 26 que se extienden hacia abajo desde la parte superior 16. Como se muestra, hay una pared lateral 26 de un diseño circular o cilíndrico. Como alternativa, puede haber 3, 4 o más paredes laterales, si se desea (no mostradas).

De modo preferente, el cuerpo 22 está fabricado en una sola pieza de plástico o vidrio moldeado. Como alternativa, puede estar fabricado a partir de dos o más piezas de plástico o vidrio que sean soldadas entre sí por ejemplo por calor, pegamento, o juntas (no mostradas). Pueden utilizarse polímeros apropiados para formar la parte superior y el cuerpo que incluyan, pero no se limiten a, policarbonatos, poliésteres, nailons, resinas de PTFE y otros fluoropolímeros, resinas acrílicas y metacrílicas y copolímeros, polisulfonas, poliétersulfonas, poralilsulfonas, polistirenos, polieterimidias, nailons, poliésteres, tereftalatos de polietileno (PTE), cloruros de polivinilo, cloruros de polivinilo clorados, ABS y sus aleaciones y mezclas, poliolefinas, de modo preferente, polietilenos como por ejemplo polietileno lineal de baja densidad, polietileno de baja densidad, polietileno de alta densidad, y polietileno de peso molecular ultraalto y sus copolímeros, polipropileno y sus copolímeros y poliolefinas generadas a partir de metaloceno. Polímeros preferentes son las poliolefinas, en particular polietilenos y sus copolímeros, polistirenos, y policarbonatos. La parte superior y el cuerpo pueden estar compuestos por el mismo polímero o por polímeros diferentes si se desea. En formas de realización reutilizables, el cuerpo puede estar fabricado a partir de vidrio, acrílico u otros materiales no deletéreos con relación al proceso. El cuerpo 22 puede también ser una bolsa de plástico desechable, como es sabido en la técnica.

Así mismo, se disponen, en el biorreactor 2 de este ejemplo uno o más orificios 30 (en este ejemplo hay tres tipos 30a - c (para un total de 5 orificios) formados en la parte superior 16 y uno o más orificios 32 en el cuerpo 22 (en este ejemplo hay al menos dos tipos 32a - b diferentes para un total de siete orificios en total). La parte superior 16 y el cuerpo 22 pueden presentar múltiples orificios de estilos similares y / o diferentes para disponer uno con la pluralidad de orificios, del tipo deseado, en los emplazamientos deseados a lo largo del biorreactor 2. Estos orificios 30, 32 o al menos una porción de ellos están formados como parte de la parte superior 16 y / o del cuerpo 22. Pueden estar formados con unos filetes que se acoplen con unas cubiertas sellables como por ejemplo unas tapas cerradas, unas tapas con un taladro pasante dentro de la junta, o diversos empalmes Luer. Como alternativa, pueden practicarse uno o más orificios en la parte superior 16 de plástico y / o en el cuerpo 22 mediante

el taladrado o quemadura de un agujero y, a continuación, el montaje (como por ejemplo mediante termouniones o adhesivos) de un orificio en posición a través de o alrededor del agujero. Pueden adaptarse muchos estilos y tamaños de orificios diferentes.

5 Los orificios 30a pueden ser utilizados para la entrada o la salida de líquidos o gases o para sondas, como por ejemplo las sondas de pH, termómetros o termopares o elementos similares. Los orificios 30b pueden utilizarse para fines similares. El orificio 30c está dispuesto para su empleo del árbol agitador descrito con mayor detalle en la presente memoria. Como alternativa, si el biorreactor es un diseño de elevador neumático y no utiliza una varilla agitadora, el orificio 30c puede ser utilizado para albergar la tubería de aire comprimido sobre el agitador en o cerca  
10 del fondo del cuerpo o para cualquier otra finalidad deseada. Los orificios 32a pueden ser utilizados para la toma de muestras del líquido o para sondas, por ejemplo de pH, la temperatura, el oxígeno disuelto, el nivel de la lactosa, etc. como es habitual en dichos biorreactores. Los orificios 32a, aunque se muestran formados sobre la pared lateral 26, pueden también estar formados en el fondo, si se desea, como se muestra en la Figura 2. El orificio 32b es un orificio con válvula que puede utilizarse para alimentar gas al cuerpo 22 y / o como drenaje o salida del cuerpo.  
15 Puede desempeñar ambas funciones mediante la fijación de una válvula de 3 posiciones o de un tubo con forma de Y con unas válvulas, por ejemplo válvulas de pinza sobre cada brazo de la Y para controlar el flujo (no mostrado). Un sistema apropiado para la válvula del orificio 32b es un conector LYNX® disponible en Millopore Corporation de Billerica, Massachusetts y como se muestra en la Solicitud de Patente No. 2005/0016620.

20 De modo preferente, uno o más orificios 32 del cuerpo están formados en un emplazamiento por debajo del nivel de la superficie de contacto del líquido / gas normal del biorreactor.

Si se desea uno o más de los orificios 32a o b de la FIG. 1 pueden ser utilizados para alimentar gases al interior del cuerpo. Una frita de plástico por ejemplo un material poroso POREX®, una membrana microporosa o una piedra  
25 cerámica o un relleno de material sinterizado pueden ser fijados al interior del orificio dentro del cuerpo para suministrar las burbujas de gas con el tamaño deseado. Como alternativa, un orificio 30a en la parte superior 16 puede ser utilizado para sostener un tubo que se extienda hacia abajo hasta el interior del cuerpo para suministrar la alimentación de gas. También aquí, se puede utilizar una frita o una piedra cerámica o un filtro de metal sinterizado o una membrana para obtener el tamaño de burbujas deseado. Como alternativa, los gases pueden ser suministrados  
30 al interior del cuerpo a través del filtro / membrana 110 porosa dentro del montaje de células agitadas y la alimentación de gas puede suministrarse a través del orificio pasante 32b.

La FIG. 2 muestra un biorreactor 2 con la parte superior 16 y el cuerpo 22 cerrados de forma estanca entre sí y un mecanismo 14 de agitación apropiado en posición. El mecanismo de agitación mostrado está constituido por un árbol 40 y por una o más palas, un disco circular, unas hélices y unos álabes o elementos similares 42. El árbol 40  
35 se extiende a través del orificio 30c y está conectado al árbol 20 del mecanismo 12 de accionamiento (no mostrado). De modo preferente, una o más juntas tóricas dispuestas en el orificio 30c permiten el desplazamiento del árbol 40 sin comprometer la integridad de la junta estanca dispuesta dentro del cuerpo 22. Como alternativa, la "agitación" para evitar el atasco puede llevarse a cabo mediante ondas ultrasónicas o vibración dirigida hacia la membrana o la superficie de filtro para impedir que los elementos sólidos se agrupen sobre la superficie. Otro procedimiento para  
40 impedir el atascamiento del filtro / membrana es hacer que los sólidos floten sobre la parte superior de la fase líquida introduciendo burbujas de gas que se adhieran a los sólidos.

De acuerdo con determinados ejemplos, el biorreactor 22 es un tubo cilíndrico y está fijado de manera amovible y de forma estanca a una base para obtener un montaje de células agitadas. Por ejemplo, en la forma de realización mostrada, el árbol 40 se extiende por debajo de la pala 42 por medio de una porción 40' corta del árbol, y se añade  
45 una pala adicional o elemento similar 42' (FIG. 7). La pala 42', de modo preferente, está situada justo por encima de la membrana 110 (analizada más adelante) en la base para evitar el contacto con la membrana lo que podría dañarla. Situada de esta manera, agita el fluido justo por encima de la membrana e impide que los sólidos (por ejemplo, las microesferas de afinidad, el precipitado o el coágulo) se asienten sobre la membrana, lo que tiende a atascar u obturar los poros de la membrana. De modo preferente, la pala es lo suficientemente ancha para que  
50 sustancialmente se corresponda con la anchura del diámetro efectivo de la membrana, o para que sea ligeramente más pequeña que dicha anchura para conseguir una agitación uniforme del fluido sobre el área de filtración efectiva de la membrana. En determinadas formas de realización, la pala 42' puede ser construida a partir de un material apropiado, como por ejemplo un material de caucho o de tipo esponjoso, de manera que el contacto con la superficie de la membrana durante la agitación no dañe la membrana, y resulte aceptable, para asegurar aún más que los sólidos no se asienten sobre la superficie de la membrana. Los expertos en la materia apreciarán que se incluyen en  
55 el alcance de las formas de realización divulgadas en la presente memoria medios distintos de una pala, por ejemplo un disco circular o una agitación de ondas, para agitar suficientemente el fluido del espacio interior del cuerpo 22.

Dirigiendo la atención a la FIG. 3, se muestra una base 100 del biorreactor que incluye una superficie 101 de soporte formada con unos surcos 102 o elementos similares para el flujo de fluido. La configuración de los surcos 102 no  
60 está particularmente limitada, aunque la configuración preferente es de círculos concéntricos, como se muestra. Los surcos 102 están en comunicación de fluido con una abertura 103, la cual, a su vez, está en comunicación de fluido con el orificio 32b para drenar el fluido procedente de la base 100.

La superficie 101 de la base 100 soporta una o más membranas 110 (FIG. 4). De modo preferente, una de las una o más membranas es relativamente un filtro o membrana de de filtración grosera, en particular cuando el contenido de los sólidos del caldo es elevado, por ejemplo de unos sólidos por volumen de aproximadamente entre un 20 y un 35%. El uso de un filtro o membrana de filtración grosera como etapa de filtración inicial contribuye a proteger y prolongar la vida útil del filtrado posterior corriente abajo por medio de membranas más apretadas, generalmente más costosas, por ejemplo membranas de calidad esterilizante de 0,2 micrómetros (analizadas con mayor detalle más adelante). Membranas adecuadas incluyen pero no se limitan a, polímeros, como por ejemplo, sin limitación, olefinas, por ejemplo polietileno incluyendo polietileno de peso molecular ultraalto, polipropileno, copolímeros EVA y olefinas alfa, polímeros olifínicos de matocileno, PFA, MFA, PTFE, policarbonatos, copolímeros de vinilo, por ejemplo PVC, poliamidas, por ejemplo nailon, poliésteres, celulosa, acetato de celulosa, celulosa regenerada, composites de celulosa, polisulfona, poliétersulfona, poliarilsulfona, polifenilsulfona, poliacrilonitrilo, fluoruro de polivinilideno (PVDF) y mezclas de estos. La membrana seleccionada depende de la aplicación, de las características de filtrado deseadas, del tipo y tamaño de las partículas que deben ser filtradas y del flujo deseado. Membranas preferentes a base de filtros incluyen DURAPORE®, membranas PVDF disponibles en Millipore Corporation de Billerica Massachusetts, membranas de MILLIPORE EXPRESS® y MILLIPORE EXPRESS® PLUS o SH PES disponibles en Millipore Corporation de Billerica Massachusetts. También pueden utilizarse prefiltros, filtros de profundidad y similares en estas formas de realización, por ejemplo prefiltros Poligard® (prefiltros Poligard CE) y filtros de profundidad (filtros de profundidad Poligard CR) disponibles en Millipore Corporation de Billerica Massachusetts.

Dependiendo de la mezcla, del polímero y de la naturaleza de la biomolécula, el filtro puede ser hidrofílico o hidrofóbico. Filtros preferentes son hidrofílicos y son bajos de proteínas.

El filtro, ya sea una membrana u otro elemento, puede la fijación tener un tamaño de poro simétrico a lo largo de su profundidad como por ejemplo las membranas DURAPORE® PVDF disponibles en Millipore Corporation de Billerica Massachusetts, o puede ser de tamaño de poro asimétrico a través de su grosor como en las membranas MILLIPORE EXPRESS® y MILLIPORE EXPRESS® PLUS o SH PES de Millipore Corporation de Billerica Massachusetts. Puede contener una capa de prefiltro si se desea, o bien como una capa corriente arriba separada o como una porción corriente arriba integral de la propia membrana.

Dependiendo del tamaño de las partículas generadas, puede haber casos en los que la membrana sea una membrana de ultrafiltrado. Por ejemplo, en los casos en los que el tamaño de las partículas sea pequeño en comparación con el tamaño de los poros de una membrana microporosa, entonces sería más apropiada una membrana con unos poros más pequeños (en los márgenes del UF) para evitar atascos. Membranas apropiadas ultrafiltrantes incluyen celulosa regenerada y poliétersulfona, incluyendo las de un tamaño de poro superior a 0,2 micrómetros, por ejemplo en términos generales las de tamaños de poro de 0,45, 0,65, 1,0, 2,0 micrómetros o mayor. De manera opcional, un soporte poroso (no mostrado) puede ser situado entre la superficie 101 de la base y la(s) membrana(s) 110. La(s) membrana(s) (si está presente el soporte) son cerradas herméticamente contra la base como por ejemplo mediante una junta tórica 106, la cual, a su vez, puede ser mantenida en posición mediante un anillo 107 de soporte, por ejemplo un anillo acrílico. Cuando se utilice más de una membrana 110, pueden estar ensambladas en una relación apilada. Cuando se utilice más de una membrana, cada membrana no necesita presentar las mismas características de comportamiento (por ejemplo, tamaño de poro, flujo, capacidad, química de superficie, etc.). Por ejemplo, la membrana superior contra la pala 42' puede tener un tamaño de poro mayor que el de la(s) membrana(s) inferior(es) y / o puede ser de un material diferente al de la(s) membrana(s) inferior(es).

El cuerpo 22 del biorreactor, que puede ser un tubo cilíndrico, está situado en relación de estanqueidad con la base 100, como se muestra en la FIG. 5. Se dispone una pluralidad de patas 6' que se extienden hacia abajo desde la base 100 para soportar dicha base.

En determinadas formas de realización, cuando se desea una purificación adicional, se puede añadir otra base de filtro al montaje, como se muestra en las FIGS. 5 y 6. Así, se provee una base 100', similar a la base 100, también con una superficie de soporte que presenta unos surcos apropiados, y una o más membranas soportadas de manera estanca sobre aquella, por ejemplo con una junta tórica apropiada y un anillo de soporte. Por ejemplo, se puede utilizar una membrana esterilizante, por ejemplo una membrana de 0,2 micrómetros (de manera opcional junto con un soporte poroso apropiado). Acoplado de manera estanca a la base 100' del filtro se encuentra un alojamiento 22', que habilita una cavidad o un espacio interior entre la base 100 del biorreactor y la base 100' del filtro. El alojamiento 22' puede ser un tubo cilíndrico, de modo preferente con el mismo diámetro que el alojamiento 22 del biorreactor y fabricado a partir del mismo material. Debe tener una altura suficiente para acomodar al menos una porción del volumen del fluido que tiene que ser purificado que queda alojado directamente desde el biorreactor. El borde superior del alojamiento 22', de modo preferente, sobresale radialmente hacia dentro y, de modo preferente, incluye una junta tórica 106' de manera que el alojamiento 22' y la base 100 pueden estar fijadas en una relación de estanqueidad. Puede disponerse una pluralidad de patas 6'', que se extiendan hacia abajo desde la base 106' para soportar el montaje. Aunque es preferente que la base 100' del filtro forme parte integrante del montaje del biorreactor para formar un montaje del biorreactor de una sola pieza para el tratamiento de las muestras y la purificación directa, en determinadas formas de realización, esta etapa de purificación posterior podría llevarse a cabo por un filtro que estuviera físicamente separado (aunque, de manera opcional, en comunicación de fluido) del cuerpo 22 del biorreactor.

El alojamiento 22' incluye un orificio 50 de entrada que puede estar situado en comunicación de fluido con la salida 32b de la base 100, por ejemplo mediante una tubería 51 apropiada (FIG. 5). La base 100' del filtro incluye un orificio 32b' de salida en comunicación de fluido con el drenaje (no mostrado) de la base, para dirigir la biomolécula de interés hasta un punto de utilización apropiado, como etapa de purificación adicional (por ejemplo una cadena de tratamiento cromatográfico).

Una forma de realización alternativa, consiste en disponer la salida del segundo alojamiento 22' en comunicación de fluido con la salida 32 de la base 100 pero disponiendo el segundo alojamiento sin que contenga ningún filtro o membrana. En vez de ello, el orificio 32' de salida está en comunicación de fluido por medio de un tubo u otro conducto (no mostrado) con un dispositivo de filtro autónomo (no mostrado), por ejemplo un filtro Millex® o un filtro Optiscale® u Opticap® que, a continuación, esterilizan los filtros de la biomolécula de interés. La salida de este dispositivo de filtro es entonces conectada a un punto de utilización apropiado, como etapa de purificación adicional (por ejemplo, una cadena de tratamiento cromatográfico).

Un equipo apropiado de válvulas y de detección puede estar asociado con una o más de las diversas entradas y salidas para detectar y medir y controlar el flujo o cualquier otra característica, por ejemplo la presencia de la biomolécula o la presencia de impurezas, en cuanto sea apropiado o se desee. Por ejemplo, durante la fase de cultivo de las células, la salida 32b de la base 100 está cerrada, de manera que el fluido permanezca en el cuerpo 22 cuando el gas es alimentado a través del orificio 32a o 30a.

En determinadas formas de realización en las que se añade un polímero a un caldo de cultivo de células para unir de manera selectiva y liberable una biomolécula de interés, los polímeros apropiados incluyen poli (N - vinilcaprolactamo), poli (N - vinilisobutiramida), poli (N - acrilolipiperidina sustituida), incluyendo [poli (N - isopropilacrilamida), poli (N, N' - dietilacrilamida), y poli (N - acrilol - N -alquilpiperacina)]. Hidroxialquilcelulosa, copolímeros de ácido acrílico y de ácido metacrílico, polímeros y copolímeros de 2 - o 4 - vinilpiridina y quitosán con ya sea un ligando o un grupo funcional fijado a él.

Biomoléculas de interés apropiadas incluyen proteínas y anticuerpos. Anticuerpos apropiados incluyen un anticuerpo seleccionado entre el grupo compuesto por un anticuerpo recombinante, un anticuerpo monoclonal recombinante, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo humanizado y un fragmento de anticuerpo.

En funcionamiento, el dispositivo estéril es situado dentro de la plataforma y las distintas conexiones para el aire, el líquido, las sondas, la toma de muestras, etc. están fijadas al dispositivo en los orificios apropiados. El dispositivo es llenado con unos medios hasta un nivel deseado formando una superficie de contacto del líquido / aire en algún punto por debajo en el que la parte superior 16 está fijada al cuerpo 22 para dejar un espacio cabecero de gas como es habitual en dichos dispositivos. Al menos un orificio 32 está por debajo del nivel de la superficie de contacto.

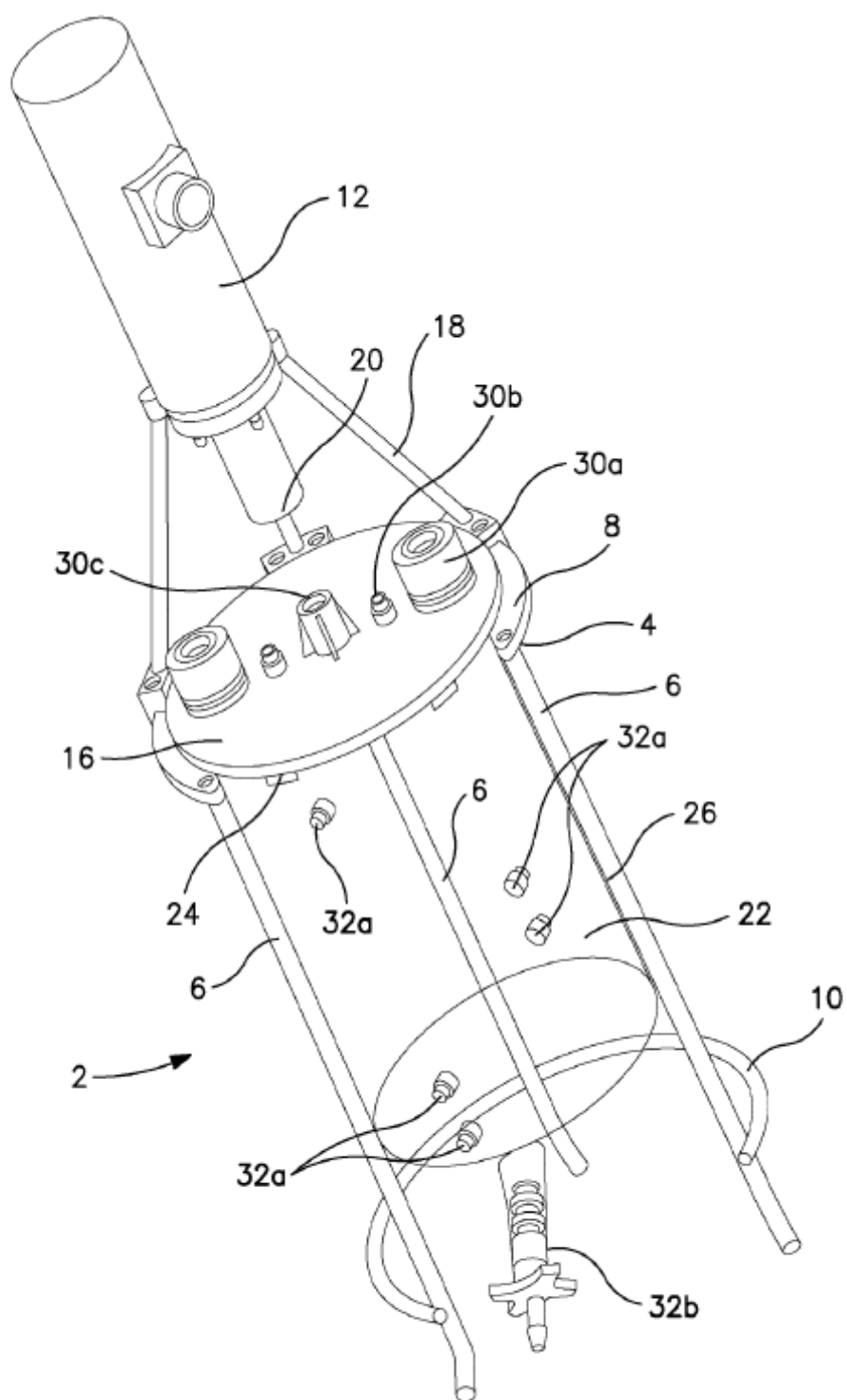
A continuación se lleva a cabo la siembra de los medios con el organismo que debe ser cultivado, ya sea una planta, una célula animal (células CHO o NSO, por ejemplo), virus, levadura, hongo o bacteria (por ejemplo E. coli) y se revuelve o agita el líquido y el aire / gases y los líquidos son desplazados hacia dentro o hacia fuera del dispositivo de manera que hagan prosperar de manera eficaz el cultivo dispuesto en el interior.

Se añade un polímero disoluble sometido a un determinado conjunto de condiciones de tratamiento, y se hace insoluble y precipita la solución tras un cambio de las condiciones (por ejemplo, temperatura, concentración salina, luz, campo eléctrico o pH). Como alternativa, se pueden añadir unas microesferas de afinidad o de intercambio de iones o unas microesferas con cualquier ligando o funcionalidad capaz de purificar la biomolécula, para su unión con la biomolécula de interés o con las impurezas solubles. La agitación continua para impedir que los sólidos se asienten, y el sólido que, en esta forma de realización, incluye el precipitado que contiene el polímero, las impurezas, por ejemplo las células y los residuos de células, las proteínas de células anfitrionas, el ADN y elementos similares y la biomolécula deseada pueden ser lavadas una o más veces (por ejemplo, con una disolución amortiguadora) para asegurar que han sido eliminadas todas las impurezas del líquido o que han quedado atrapadas en o sobre el polímero. La(s) etapa(s) de la lavado puede(n) llevarse a cabo mediante filtración a través de las una o más membranas dispuestas en la base 100, desplazando el sobrenadante para su eliminación a través del orificio 32b.

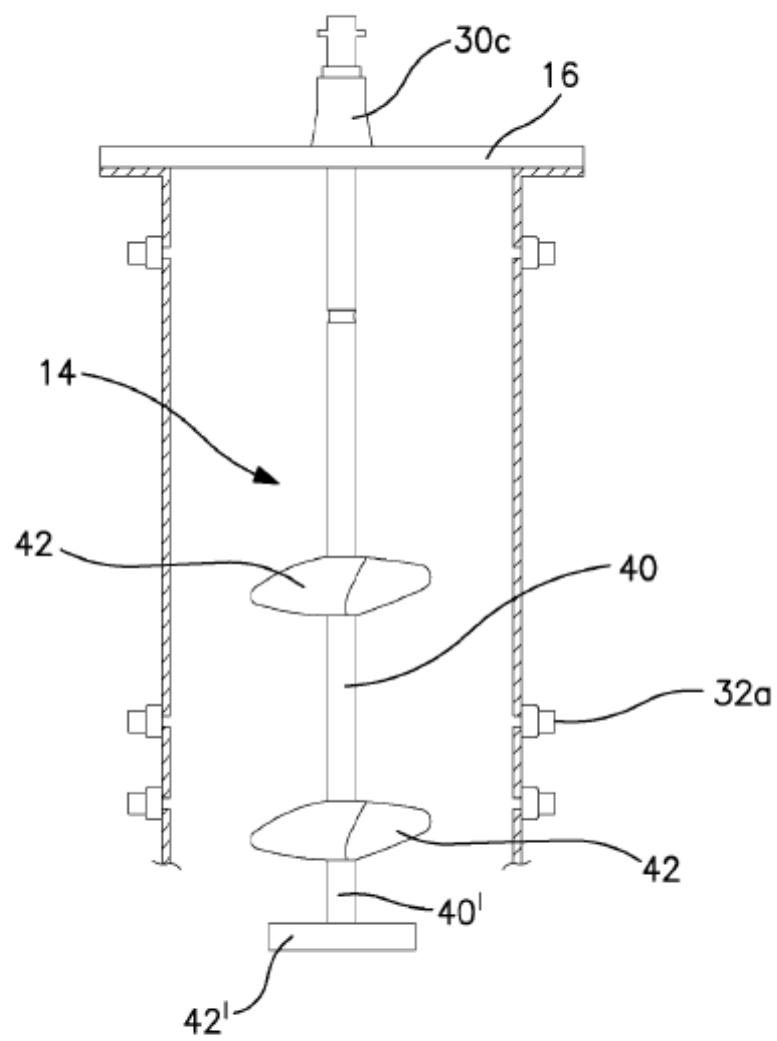
La biomolécula de interés es a continuación recuperada, por ejemplo mediante elución selectiva de la biomolécula diana a partir del precipitado (o de las microesferas) por ejemplo alterando la resistencia iónica y / o las condiciones del pH de la disolución mientras la impurezas, que incluyen el material soluble e insoluble, permanecen mezcladas con el polímero precipitado. La recuperación se lleva a cabo, de modo preferente, junto con una etapa de filtrado de esterilización, haciendo que la base 100' de filtrado se sitúe en comunicación de fluido con la base 100, como por ejemplo conectando la salida de la base 100 a la entrada 50 del cuerpo 22'. Por consiguiente, el permeado procedente de la salida de la base 100 entra en el cuerpo 22', humedece la membrana 110', y se produce una filtración a través de la membrana 110'. La biomolécula de interés purificada es entonces recuperada en el depósito de elución a través del orificio 32b de salida de la base 100'. El complejo de polímero - impurezas precipitado (o las microesferas de afinidad) puede ser desechado. La fuerza de accionamiento del filtrado puede ser presión o vacío.

## REIVINDICACIONES

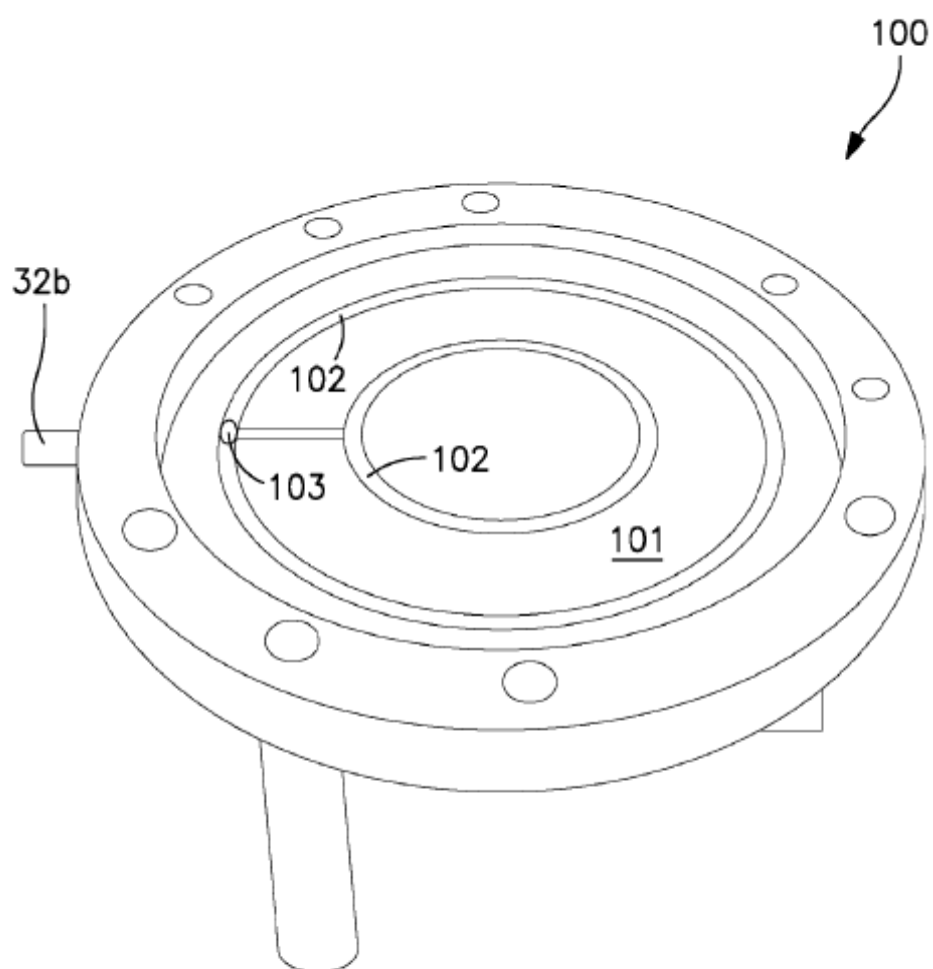
- 1.- Un montaje de cultivo y tratamiento de una muestra de fluido que comprende un primer recipiente (22) que presenta un espacio interior, una primera base (100) fijada de manera estanca a dicho recipiente (22) y al menos una membrana (110) fijada de forma estanca a dicha base (100) para filtrar dicha muestra de fluido; una salida (32b) en dicha base (100) para la muestra de fluido filtrada, un segundo recipiente (22') en comunicación de fluido con la salida (32b) de dicha primera base (100), en el que el segundo recipiente (22') está fijado de manera estanca a una segunda base (100'), comprendiendo dicha segunda base (100') una membrana (110') y una superficie de soporte que comprende unos surcos para el flujo de un fluido.
- 2.- El montaje de la reivindicación 1, en el que dicho segundo recipiente (22') soporta al menos una membrana (110').
- 3.- El montaje de la reivindicación 1, en el que dicho primer recipiente (22) es un biorreactor.
- 4.- El montaje de la reivindicación 1, que comprende además un agitador dentro del cuerpo de dicho primer recipiente (22) para agitar dicha mezcla.
- 5.- El montaje de la reivindicación 1, en el que dicha primera base (100) comprende una superficie (101) de soporte formada con unos surcos (102) para el flujo de fluido, estando dichos surcos (102) en comunicación de fluido con una abertura (103) en dicha base, estando dicha abertura en comunicación de fluido con un orificio (32b) para drenar un fluido desde la base (100).
- 6.- El montaje de la reivindicación 1, en el que dicha al menos una membrana (110) cerrada de forma estanca con dicha primera base (100) es una membrana de filtración grosera y en el que dicha membrana (110') de dicha base (100') es una membrana de calidad para esterilización de 0,2 micrómetros.
- 7.- Un procedimiento para purificar una biomolécula seleccionada entre el grupo compuesto por proteínas y anticuerpos a partir de una mezcla que contiene impurezas, que comprende:
  - (a) la provisión de un montaje que comprende la provisión de un primer recipiente (22) que presenta un espacio interior, una primera base (100) adaptada para ser fijada de manera estanca a dicho primer recipiente (22) y que soporta al menos una membrana (110) cerrada de forma estanca sobre dicha primera base (100) para el filtrado de dicha mezcla; una salida (32b) en dicha base (100), un segundo recipiente (22') en comunicación de fluido con la salida (32b) de dicha primera base (100) y una segunda base (100') fijada de manera estanca sobre dicho segundo recipiente (22'), comprendiendo dicha segunda base (100') una segunda membrana (110') y una superficie de soporte que comprende unos surcos para el flujo de un fluido,
  - (b) la provisión de la mezcla en un conjunto de condiciones,
  - (c) la adición de uno o más polímeros, solubles en dicha mezcla bajo un conjunto de condiciones y capaz de enlazar de manera reversible y selectiva con la biomolécula, en el que dichos uno o más polímeros se seleccionan entre el grupo que consiste en poli (N - vinilcaprolactamo), poli (N - acrilolipiperidina), poli (N - vinilisobutiramida), poli (N - isopropilacrilamida), poli (N, N' - dietilacrilamida), poli (N - acrilol - N - alquilpiperazina), hidroxialquilcelulosa, copolímeros de ácido acrílico y de ácido metacrílico y polímeros y copolímeros de 2 - o 4 - vinilpiridina y quitosán o bien un ligando o un grupo funcional fijado a él,
  - (d) la mezcla de uno o más polímeros disueltos en toda la mezcla,
  - (e) la precipitación en la solución, modificando el conjunto de condiciones en la mezcla, de los uno o más polímeros y la biomolécula enlazada;
  - (f) el lavado de dicho precipitado situando en contacto dicho precipitado con una solución de lavado y el filtrado del sobrenadante a través de dicha primera membrana,
  - (g) la recuperación de la molécula enlazada separándola del polímero y el filtrado de la biomolécula a través de dicha segunda membrana.
- 8.- El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho filtrado de dicho sobrenadante y dicho filtrado de dicha biomolécula son llevadas a cabo por el mismo aparato.
- 9.- El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la biomolécula es un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo recombinante, un anticuerpo monoclonal recombinante, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo humanizado y un fragmento de anticuerpo.
- 10.- El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicha biomolécula es una proteína.



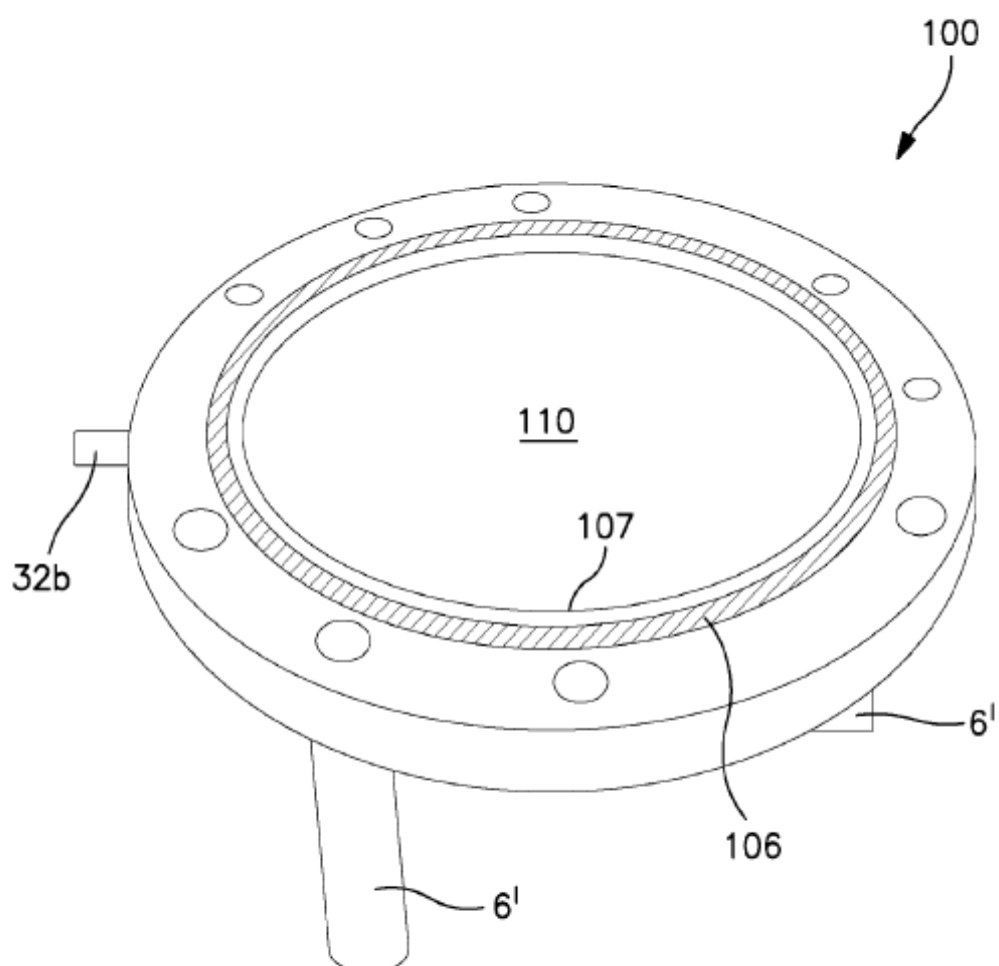
**FIG. 1**



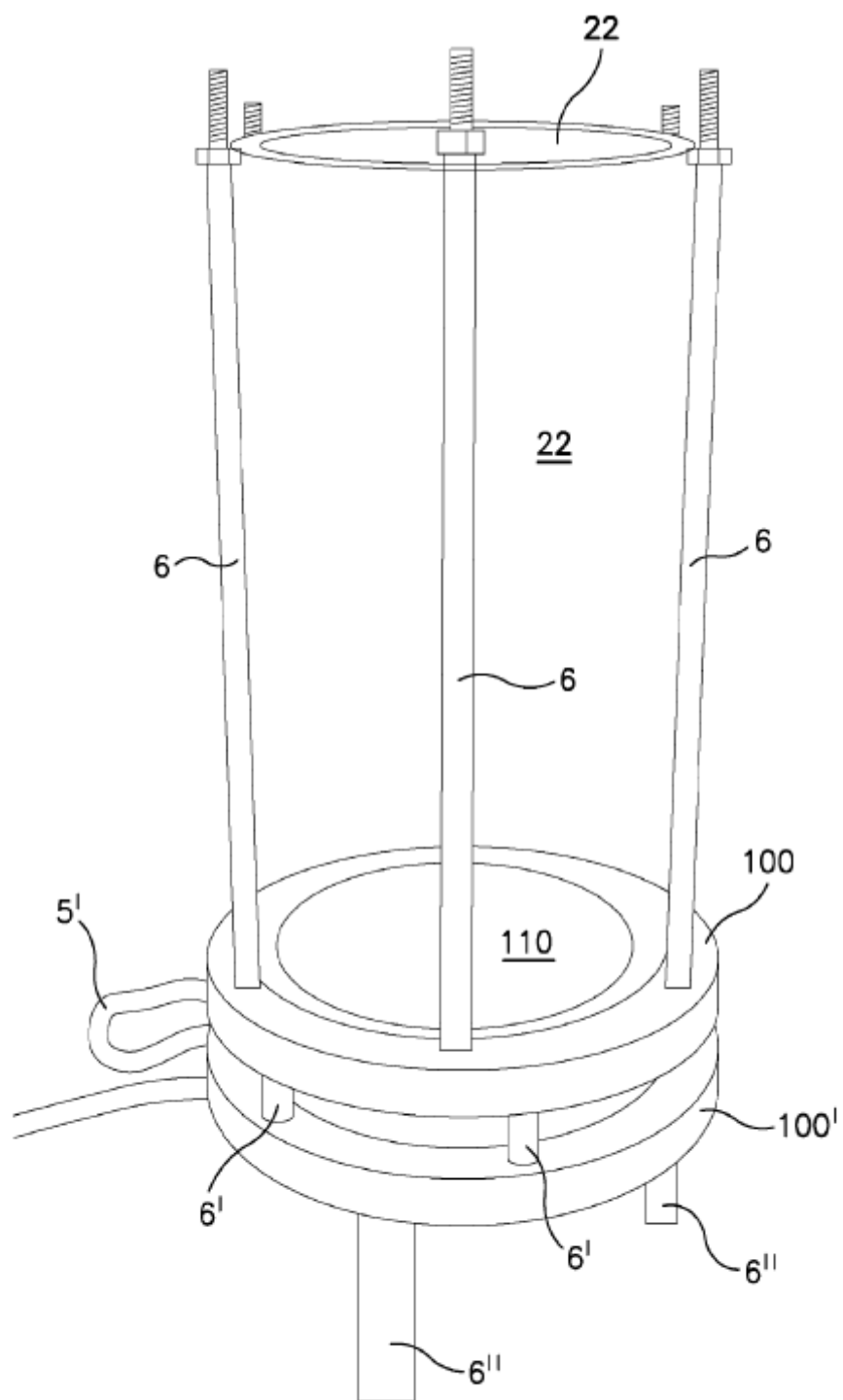
**FIG. 2**



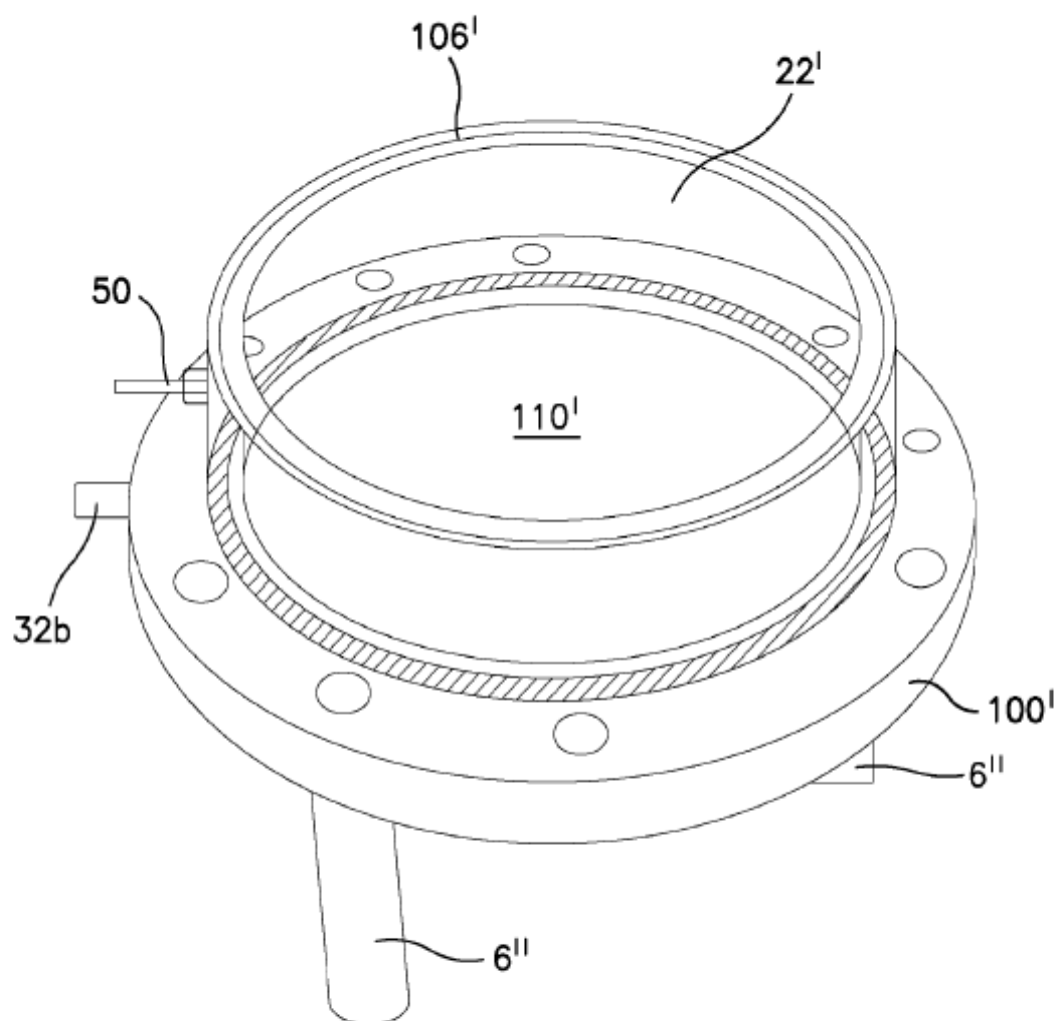
**FIG. 3**



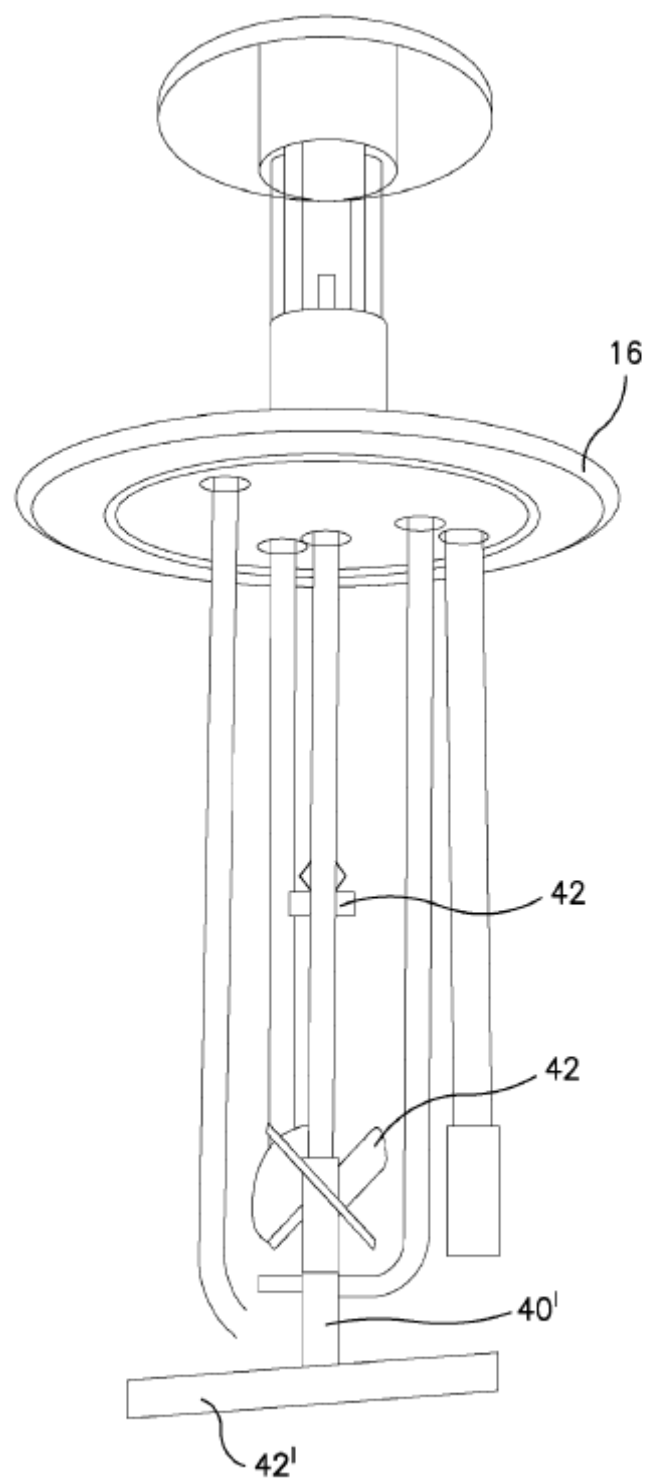
**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**