



TM TAMAYO
ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-031230- -00008-0000

Fecha: 2011-07-29 16:01:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 106

Señor

**JEFE DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y**

E. S. D.

REF: EXPEDIENTE: 07-031230

**TITULO: "DISPOSITIVOS Y MÉTODOS PARA LA FABRICACIÓN
CONTINUA INTEGRADA DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS"**

ACTUACIÓN: RESPUESTA A EXAMEN DE PATENTABILIDAD

CARLOS ORLANDO MAYA RODRÍGUEZ, mayor de edad, vecino de esta ciudad, identificado con la Cédula de Ciudadanía No.17.117.818 expedida en Bogotá, Abogado titulado en ejercicio y portador de la Tarjeta Profesional No. 17.402 del Consejo Superior de la Judicatura, obrando en calidad de apoderado de la sociedad BAYER HEALTHCARE LLC., Según poder debidamente conferido y legalizado, adjunto al expediente de la referencia.

Encontrándome dentro del término legal comparezco para responder el oficio de Requerimiento No. 08166 del Examen de Patentabilidad emanado de esa Oficina, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de 2.000 de C.A.N, damos respuesta en los siguientes términos.

4.- De la solicitud de Patente

4.1.- Reivindicaciones

Para atender el requerimiento, según el Artículo 30 de la Decisión 486, el señor Examinador señala que: las reivindicaciones no son claras , ya que de su sola lectura no se



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



TM TAMAYO
ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

2

puede entender le significado del término "TMP". Y sugiere hacer las aclaraciones del caso, así como la necesidad de hacer aclaraciones en el pliego reivindicatorio, aclaramos que las reivindicaciones 2-6, 9-13, 18 y 19 se modificaron para eliminar el término "aproximadamente" como lo sugirió el Examinador. Las reivindicaciones 1, 2-4, 9-11 y 18 se modificaron para aclarar adicionalmente el lenguaje.

Por lo tanto, se presenta un nuevo pliego reivindicatorio de 24 reivindicaciones, en reemplazo del anterior, pliego que está enteramente sustentado en la memoria descriptiva original y por lo tanto no amplía el alcance de la invención, dichas modificaciones se refieren a:

En la reivindicación 1 se modificó para insertar "presión de transmembrana" después de TMP como se sugirió. El sustento para esta modificación se puede encontrar en la Figura 9 y en la página 18, líneas 7-14. Las reivindicaciones 2-4 y 9-11 se modificaron para clarificar más la invención. El sustento se puede hallar en las páginas 58, línea 19 hasta 59, línea 3 y las reivindicaciones originales. Las reivindicaciones 2-6, 9-13, 18 y 19 se modificaron para eliminar el término "aproximadamente". La reivindicación 8 se ha modificado para especificar que la "ultrafiltración" es una "ultrafiltración continua"; la modificación está sustentada en toda la memoria descriptiva como se presentó originalmente; por ejemplo, en el Resumen y en la página 4, línea 27 de la publicación PCT (WO 2008/039588). Los solicitantes han modificado el recitado de un "adsorbedor/desorbedor convectivo", como se mencionó anteriormente en la reivindicación original 15, en la reivindicación 14; la reivindicación 15 se canceló y las reivindicaciones restantes se renumeraron en consecuencia. La reivindicación original 18 se modificó con propósitos de aclaración.

Los solicitantes agregaron la nueva reivindicación dependiente 22, especificando que en los procesos de la reivindicación 8, "la presión transmembrana en el proceso de ultrafiltración continua aumenta con el transcurso del tiempo". Esta reivindicación nueva está sustentada



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



TM TAMAYO
ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

por la memoria descriptiva por lo menos en la página 38, líneas 4-7 de la publicación PCT y en la Figura 12, que muestra que la presión transmembrana aumenta en el transcurso de catorce días de realizar el proceso continuo. Además, los solicitantes agregaron las reivindicaciones nuevas 23 y 24, que se relacionan con promedios de flujo que rodean al proceso de purificación continua uno a otro usando relaciones expuestas por lo menos en la páginas 54, línea 21 hasta 55, línea 11 de la memoria descriptiva.

4.2- Claridad de la descripción (Art. 28 Decisión 486)

Respecto de las sugerencias del señor examinador para definir completamente el término "TEM", Se ha modificado la memoria descriptiva, e la que se ha insertado "presión transmembrana" inmediatamente antes de la primera cita de "TMP" en la página 9, línea 5 de la memoria, y además se ha incorporado su completa definición en el párrafo siguiente, de manera de clarificar más aún, según lo solicitado. También se han modificado las unidades de acuerdo con el sistema internacional como fue solicitado por el Sr. Examinador. (página 38 de la memoria)

4.3. Unidad de Invención (Art. 25 Decisión 486)

El solicitante disiente respetuosamente con el Examinador y cree que las reivindicaciones 7-22 incluyen características comunes que no se discutieron en el arte previo. Los argumentos que sustentan esta afirmación se detallan a continuación, por lo que todas las reivindicaciones son novedosas y por lo tanto están unificadas.

5.- determinación del Estado de la Técnica.

En cuanto a las objeciones formuladas por el señor Examinador con respecto a la falta de Novedad de la presente invención, por considerar las características técnicas esenciales con



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



TM TAMAYO
ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

4

las del estado de la técnica de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en el documento del estado de la técnica D1, el Solicitante manifiesta respetuosamente lo siguiente:

El Solicitante disiente respetuosamente con el examinador. Ya que el D1 de Van Reis no revela la totalidad de los elementos porque el proceso revelado por van Reis difiere de las presentes reivindicaciones en varios aspectos importantes.

En primer lugar, el proceso D1 de van Reis no incluye el elemento (a) de las reivindicaciones 7 y 14, producido mediante un proceso de fermentación por perfusión continua, o el elemento (a) de las reivindicaciones 15 y 19, un sistema de fermentación por perfusión continua. De hecho, van Reis expresa en la columna 10, líneas 62-65, "la mezcla que se ha de separar entra al dispositivo a través del conducto de entrada 1, que se comunica con un tanque de fermentación (no se muestra) si los productos que se han de separar están en un caldo de fermentación". Esta descripción no es suficiente para anticipar las presentes reivindicaciones, porque las presentes reivindicaciones establecen específicamente fermentación por perfusión continua. Van Reis no revela que el tanque de fermentación contiene un proceso de fermentación por perfusión continua. De hecho, la descripción sólo remotamente similar de van Reis es de un "cultivo de perfusión continua", en la columna 23, líneas 27-40; pero allí, van Reis revela el uso de un cultivo de perfusión continua con el único propósito de "separar fragmentos de células de células enteras" y no como parte de un proceso para "purificar una proteína de interés desde una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea". En un proceso para separar fragmentos de células de células enteras, la proteína de interés pasaría a través de la membrana junto con los fragmentos de células, mientras que solamente las células enteras serían retenidas. Por lo tanto, la descripción de la columna 23, líneas 27-40 no resuelve las deficiencias de la columna 10, líneas 62-65 con respecto al paso (a) de las reivindicaciones 7, 14, 15 y 19, con sus modificaciones.



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



TM TAMAYO
ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

5

La presente memoria descriptiva define que por "continuo" se entiende lo siguiente: Por el término "continuo" se entiende una secuencia y/u operación sin interrupción en el tiempo, durante periodos de tiempo prolongados. Como se usa con referencia a los procesos de fermentación, clarificación y filtración de la presente invención, por "continuo" se entiende que los procesos están integrados en forma física y logística como para permitir la operación sin interrupción durante un periodo de tiempo prolongado suficiente para un producto aislado estéril, sin partículas, concentrado y parcialmente purificado que contiene la proteína de interés. Por el término continuo, como se usa con referencia a los procesos de la invención, también se entiende que un proceso no se realiza en una forma en tandas (batch). Los procesos de la presente invención son capaces de operación continua, por ejemplo durante periodos prolongados que están en la gama de 1 día a varios meses sin interrumpir la operación o la secuencia de los procesos. Como se usa en la presente invención, los procesos se realizan durante un periodo continuo mayor de 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas, 3, 4, 5, 6 o más meses. Véase la página 11, líneas 22 hasta página 12, línea 4 de la memoria descriptiva (WO 2006/039588). La referencia de van Reis simplemente no revela un proceso "continuo", ya que el término "continuo" se define y se usa en la presente memoria descriptiva.

En segundo lugar, el proceso revelado en van Reis no incluye el elemento (d) de la reivindicación 7: transferir la mezcla de fluido del cultivo de tejido clarificado a un proceso de purificación continuo integrado con el proceso de extracción de partícula continuo. Si bien el proceso revelado en la Figura 2A de van Reis está seguido por un paso de purificación, van Reis revela solamente que "el retentado concentrado pasa desde la unidad de filtración 7 a través del conducto de salida 11, donde se puede recoger y procesar nuevamente, si fuera necesario, para obtener la especie de interés deseada" (columna 11, líneas 17-20 de van Reis). La descripción simplemente no expresa que el fluido se mueve hacia un proceso de purificación continua que está integrado con el proceso



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



TM TAMAYO
ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

6

de extracción de partícula continuo; van Reis es más bien vago sobre este punto. Por consiguiente, van Reis no revela un proceso que comprende el elemento (d) de la reivindicación 7.

En tercer lugar, el proceso revelado en la Figura 2A de van Reis no se describe como uno en el cual "el promedio de flujo específico se mantiene sustancialmente constante durante toda la ultrafiltración continua", como reza en la reivindicación 1, o "el promedio de flujo específico de la mezcla durante todo el proceso de fermentación por perfusión continua, el proceso de extracción de partícula continuo y el proceso de purificación continua se mantiene sustancialmente constante", como reza en las reivindicaciones 7 y 14. Aunque van Reis expresa en la columna 21, líneas 35-36, "donde la TMP es sustancialmente constante a través de la membrana completa", esto no se puede extrapolar de manera que signifique un promedio de flujo sustancialmente constante porque: (1) van Reis aclara en la columna 9, líneas 16-18 que: "TMP sustancialmente constante" se refiere a TMP en función de la longitud de la membrana, no en función del tiempo de filtración" y por lo tanto tampoco se refiere a la TMP durante el proceso completo; y (2) TMP constante no sugiere necesariamente un promedio de flujo específico constante. De hecho, van Reis expresa en la columna 10, líneas 19-21 que la "TMP no aumenta con el tiempo de filtración y no necesariamente se mantiene constante durante toda la filtración". Por lo tanto, en general, simplemente no hay ninguna revelación en van Reis de un proceso en el cual el promedio de flujo específico de la mezcla se mantiene sustancialmente constante.

Además, van Reis no revela el elemento (d) de la reivindicación 14: "transferir el fluido de cultivo de tejido clarificado a un recipiente de onda integrado con el proceso de extracción de partícula continuo", o el elemento (c) de la reivindicación 20, "un recipiente de onda integrado y adaptado para recibir en forma continua el fluido de cultivo de tejido clarificado".



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



7

Con respecto a la “adsorción/desorción convectiva” citada en la reivindicación original 15 (ahora incorporada en la reivindicación modificada 14) y la reivindicación original 22 (ahora reivindicación 21), indicamos que la HPLC, citada en van Reis, es diferente del proceso de adsorción/desorción convectiva”. La HPLC descrita en van Reis es una herramienta analítica, que usa lechos de resina empaquetada en los cuales la transferencia de masa está limitada por la difusión. En cambio, la adsorción/desorción convectiva es una herramienta de purificación preparativa en la cual la transferencia de masa es predominantemente convectiva. La descripción del uso de la HPLC en van Reis no anticipa el uso de la adsorción/desorción convectiva en las presentes reivindicaciones. Por esta razón adicional, las reivindicaciones 14 y 21, con sus modificaciones, son novedosas con respecto a van Reis.

Con respecto a la nueva reivindicación 22, van Reis no enseña el elemento descripto “en donde la presión de transmembrana en el proceso de purificación continua aumenta con el tiempo”. La presión de transmembrana en el proceso de van Reis “disminuye o permanece aproximadamente constante a medida que avanza la filtración” (es decir, con el transcurso del tiempo) (ver al menos las reivindicaciones 1, 6, 7 y 12 de van Reis). Van Reis agrega en la columna 10, líneas 19-22: “Debe destacarse que la TMP no aumenta con el tiempo de filtración y no se mantiene necesariamente constante a través de la filtración. La TMP puede permanecer aproximadamente constante con el tiempo o disminuir a medida que avanza la filtración”.

Con respecto a las nuevas reivindicaciones 23 y 24, van Reis no enseña los elementos reivindicados en donde el promedio de flujo del permeato (Qp) y el retentato (Qi) se ajustan para coincidir con el promedio de flujo cosecha Qh de la fermentación, de manera que:

$$Qp + Qi = Qh,$$



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



TM TAMAYO
ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

8

En donde Q_p se mantiene sustancialmente constante, y donde los promedios de flujo se ajustan y controlan de manera que se alcance un factor de concentración deseada cf que satisfaga:

$$Q_i: 1/cf * Q_h$$

Por todo lo expuesto, el documento D1 de van Reis no revela todos y cada uno de los elementos de las reivindicaciones 1 a 24, tal como han sido modificadas. Por lo tanto, las reivindicaciones resultan novedosas frente al arte previo citado, encontrándose la presente solicitud en condiciones de ser concedida

En virtud de todo lo expuesto, mi representado respetuosamente manifiesta que el actual pliego reivindicatorio es también inventivo respecto a D1 citado por su despacho.

De acuerdo con el nuevo capítulo descriptivo y nuevo pliego reivindicatorio anexos, la presente invención cumple con los requisitos de patentabilidad exigidos en el Art. 14 de la Decisión 486/2000 de la C.A.N, en el sentido de Novedad, Nivel inventivo y Aplicación Industrial.

Por lo antes expuesto, ruego a usted dar por subsanado dicho requerimiento, sin perjuicio de lo cual desde ya nos acogemos a lo dispuesto por el inciso segundo del artículo 45 de la decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones que a la letra dice: "(...) Cuando la oficina nacional competente estimare que ello es necesario para los fines del examen de patentabilidad, podrá notificar al solicitante dos o más veces (...)" (Subrayado para destacar).



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



TM TAMAYO
ROYALTIES • PATENTS • TRADEMARKS

9

NOTIFICACIONES

Mi poderdante y yo recibiremos notificaciones en la Secretaría de su Despacho o en mi Oficina de Abogado ubicada en la Carrera 13A No. 28-38 Ofc. 230 MZ. 2 Parque Central Bavaria de la ciudad de Bogotá D.C.

Del señor Jefe,

CARLOS ORLANDO MAYA RODRÍGUEZ

No.17.117.818 expedida en Bogotá,
T.P No. 17.402 del C.S.J.

**COLOMBIA:**

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com



DISPOSITIVOS Y MÉTODOS PARA LA FABRICACIÓN CONTINUA INTEGRADA DE MOLECULAS BIOLÓGICAS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un método y un sistema mejorados para purificar una molécula de interés desde una mezcla heterogénea de moléculas. Más particularmente, la presente invención se dirige a métodos para purificar una proteína de interés en una corriente de alimentación fluida de cultivo de tejido desde un proceso de fermentación por perfusión continua.

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

Para los expertos en el tema es bien conocido que en los últimos años varios procesos de cultivo celular continuo, también llamados procesos de perfusión continua, se han establecido con gran éxito comercial. Sin embargo, el proceso de separación seguido de la fermentación por perfusión continua es generalmente un proceso en serie, y está física y logísticamente separado del proceso de corriente ascendente continuo. En estos procesos, el principal propósito del paso de separación es capturar el

producto de altos volúmenes de un supernatante de cultivo relativamente diluido. La concentración del producto tiene que enfatizarse con respecto a la logística del proceso y a los requerimientos de espacio, mientras que la extracción simultánea de contaminantes (purificación) es importante para minimizar el número requerido de otros pasos de purificación de corriente descendiente.

La Figura 1 muestra una representación esquemática de aislamiento típico en el estado del arte desde fermentación por perfusión continua, como bien saben los expertos en el área. El sistema de fermentación por perfusión continua comprende un dispositivo de retención celular (1), que hace que la mayoría de las células produzcan el producto en el sistema de fermentación. Una corriente de cosecha continua del sistema de perfusión continua, que aun contienen las algunas células, desechos y otras partículas se bombea utilizando una bomba de cosecha (2) en grandes recipientes de recolección (3), como por ejemplo tanques de acero inoxidable. Estos recipientes de almacenamiento de cosecha usualmente tienen que ser enfriados para mantener las pérdidas del producto debido a la degradación en un campo posible.

Una vez que se ha recolectado un volumen especificado, que es comúnmente después de 1-14 días o mas, los recipientes de recolección de cosecha se desconectan del recipiente de fermentación estéril y el material recolectado es designado como una serie de cosecha. El siguiente paso es extraer las células, desechos y partículas (paso 2). En escala industrial este paso comúnmente se realiza utilizando centrifugación (4) seguido de filtración de membrana de punto muerto (5) o por filtración profunda del punto muerto (6) seguido por filtración de membrana de punto muerto (7). Otra técnica a veces utilizada es la microfiltración de flujo tangencial (o "flujo cruzado"). De cualquier forma, el producto del proceso de extracción de partícula es una serie de fluido de cultivo de tejido clarificado o cTCF(8). Más detalles sobre la separación de partículas para productos biotecnológicos pueden encontrarse en los libros de texto clásicos, como por ejemplo *Biotechnology*, Vol 3, *Bioprocessing*, Wiley-VCH, 2 edition (1996), ISBN: 3527283137.

En el siguiente paso (paso 3), la serie del cultivo de tejido clarificado también se procesa para concentrar, y si es posible, purificar el producto. Esto comúnmente se realiza por ultrafiltración de flujo cruzado o por cromatografía de cama embalada.

En el caso de la ultrafiltración de flujo cruzado, cTCF se bombea en el tanque de reciclado (9) del sistema. Se utiliza una bomba (10) para empujar el material a través de un ultrafiltro de flujo cruzado. El producto se retiene con la membrana y se recicla mientras que se retiene en el tanque de reciclado, mientras que el agua y contaminantes mas pequeños se empujan a través de la membrana en el permeato (11) debido a la presión de la transmembrana generada por la caída de presión en el módulo de ultrafiltración. En cada pasaje por el filtro, cTCF además se concentra mas, y el volumen total de cTCF se reduce hasta que un factor de concentración deseado se alcanza. Una vez que se alcanza el factor de concentración deseado, el proceso se detiene, y el volumen de concentrado remanente (separación) se drena desde el sistema y se recolecta. Mas detalles sobre la ultrafiltración de flujo cruzado para la concentración de productos biotecnológicos puede encontrarse en libros de texto clásicos, como por ejemplo Biotechnology, Vol. 3, Bioprocesssing, Wiley-VCH, 2 edition (1996), ISBN: 3527283137.

En el caso de una cromatografía de cama embalada, el cTCF se bombea sobre una cromatografía en columna (12) que contiene una cama de resina embalada. El producto se une con la resina y luego se leviga en una forma purificada y concentrada (producto

aislado, 13) utilizando un amortiguador de levigación adecuado (14), luego de lo cual la columna se limpia y se regenera utilizando amortiguadores adecuados y soluciones de limpieza (14).

Otras variantes de cromatografía que se han propuesto para la concentración/ purificación de cTCF son cromatografía de cama expandida y cromatografía de membrana. La cromatografía de cama expandida puede procesar soluciones que contienen partículas. Sin embargo, la filtración del aislado luego de la cromatografía es aun requerida, aunque las áreas de filtración se reducen. La cromatografía de membrana utiliza pilas de membranas de microfiltración modificadas en lugar de camas de resina embalada. La ventaja es que la transferencia de masa es altamente convectiva antes que difusiva, lo cual permite la separación mas rápida. De lo contrario, el proceso es comúnmente equivalente con la cromatografía de cama embalada estándar. Mas detalles sobre cromatografía para concentración y purificación de productos biotecnológicos puede encontrarse en libros de texto clásicos como por ejemplo Protein Purification, Principles, High-Resolution Methods, and Applications, Wiley- VCH, 2. Edition (1998), ISBN 0-471, 18626-0.

A menudo, el producto aislado luego se congela y se almacena para su posterior uso en otros pasos de purificación de corriente descendiente.

Así, como se describe anteriormente, el proceso de aislamiento es generalmente un proceso en serie, y se separa física y logísticamente de un proceso de corriente ascendente continua. Además, mientras que la fermentación tiene que realizarse estéril, el aislamiento (es decir, la extracción de partículas y la concentración/ purificación de las mismas) se realiza esencialmente limpia pero no estéril.

Los procesos del estado del arte que se describen anteriormente presentan un número de problemas:

P1. Pérdida de rendimiento y reducción de calidad potencial debido al alto tiempo de residencia del producto. La cosecha desde la fermentación por perfusión continua necesita ser recolectada y almacenada durante períodos largos, como se establece anteriormente, antes de que la serie de aislamiento pueda procesarse. La cosecha recolectada, aunque enfriada, aun proporciona un medio perjudicial para los productos proteicos complejos e intrínsecamente inestables. Además, las significantes

pérdidas de producto ocurren, las cuales reducen la capacidad de planta y aumentan el costo de la mercadería. Además, la calidad del producto puede ser afectada adversamente.

P2. Grandes instalaciones de habitaciones frías o recipientes fríos se requieren para el almacenamiento intermedio de los grandes volúmenes de cosecha, llevando a altos costos de capital e invalidando la citada ventaja de compactado y movilidad de los fermentadores de perfusión.

P3. Las tecnologías de concentración / purificación convencionales (por ejemplo, ultrafiltración, cromatografía de cama embalada) tienen producciones volumétricas relativamente bajas, tiempos de operación importantes y requieren de relativamente intensa mano de obra. Como resultado, comúnmente no mas de 1 proceso en serie se realiza por día.

P4. Además, los procesos y métodos de aislamiento actuales tienen dificultades logísticas que tratan con cambiantes volúmenes de proceso en las plantas de fermentación que incluye mas de un fermentador. En las plantas de perfusión continua a gran escala, un número variante de fermentadores es opcional.

P5. Además, los procesos de aislamiento del estado del arte se realizan limpios pero no estériles. Esto a menudo conduce a un número importante de series rechazadas debido a asuntos de carga de microbios.

P6. La utilización de elementos descartables, como por ejemplo, filtros descartables, montajes, bolsas, etc, aunque sean muy deseados en la producción de parenterales humanos (por ejemplo, para evitar limpieza y validación de limpieza y otros asuntos) es muy cara y de hecho a menudo no resulta económico.

De tal manera, es un objeto de la presente invención proporcionar un proceso de separación de proteína continuo, integrado que es capaz de operar durante periodos largos bajo condiciones estériles.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a un aparato y proceso nuevos para purificar moléculas desde una mezcla de fluido heterogénea. Más particularmente, la invención se dirige a un proceso para purificar una molécula de interés desde una mezcla de fluido clarificado heterogénea de la cual los contaminantes se

han extraído. El proceso comprende el paso de filtrar una mezcla de fluido clarificado heterogénea mediante ultrafiltración continua en un promedio de flujo específico debajo del punto de transición de la molécula de interés en una región dependiente de presión del flujo versus la curva de **"presión de transmembrana"** (TMP), caracterizado porque el promedio de flujo específico se mantiene sustancialmente constante en todo el proceso de ultrafiltración.

El término **"presión de transmembrana"** y su sigla "TMP" significa la presión promedio aplicada desde la alimentación al lateral de filtrado de la membrana. TMP se calcula mediante $TMP[\text{barra}] = [(PF + PR)/2] - Pf$ donde PF es la presión de alimentación, PR es la presión de retención, y Pf es la presión del filtrado.

En las incorporaciones particulares, el proceso de la invención comprende filtrar la mezcla de fluido clarificada a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados aproximadamente igual entre 0,1 a 2 veces el promedio de flujo volumétrico de la mezcla de fluido clarificado en litros / hora. En otra incorporación, el proceso de la invención comprende filtrar la mezcla de fluido clarificado a

través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados aproximadamente igual entre 0,3 a 1 vez el promedio de flujo volumétrico de la mezcla de fluido clarificado en litros/ hora.

El proceso de la invención ventajosamente permite filtrar la mezcla clarificada en un promedio de flujo específico que produce una concentración de pared de menos de aproximadamente 20%, menos de 15% y menos de 10% aproximadamente mayor a la concentración de retención, sin polarización de concentración apreciable.

En una incorporación más específica, la invención se dirige a un proceso integrado, continuo y estéril para la fermentación por perfusión continua, extracción de partícula y purificación/ concentración. En un aspecto de la invención, el proceso comprende filtrar la mezcla de cultivo del tejido mediante un proceso de separación que selectivamente separa la proteína de interés desde la mezcla en un punto establecido operacional debajo del punto de transición de la proteína en la región dependiente de presión del flujo versus la curva TMP para producir un producto aislado, parcialmente purificado, concentrado, libre de partículas y estéril, donde el promedio de flujo específico a través del proceso de separación se mantiene

sustancialmente constante en niveles menores al punto de transición de la proteína.

En otro aspecto de la invención, el proceso es un proceso continuo para purificar una proteína de interés desde una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea, que comprende:

(a) producir mediante proceso de fermentación por perfusión continua una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea que contiene una proteína de interés;

(b) transferir la mezcla de fluido del cultivo de tejido a un proceso de extracción de partícula continuo integrado con el proceso de fermentación por perfusión continua;

(c) extraer los contaminantes de partículas desde el fluido de cultivo de tejido en el proceso de extracción de partícula continuo para producir un fluido de cultivo de tejido clarificado que contiene la proteína de interés;

(d) transferir el fluido de cultivo de tejido clarificado a un proceso de purificación continuo integrado con el proceso de extracción de partícula continuo; y

(e) purificar la proteína de interés desde el fluido de cultivo de tejido clarificado en el proceso de purificación continuo;

caracterizado porque el promedio de flujo específico de la mezcla a través del proceso de fermentación por perfusión, proceso de extracción de partícula continuo y el proceso de purificación continua se mantiene sustancialmente constante.

En aun otro aspecto de la invención, el proceso es un proceso semicontinuo para purificar una proteína de interés desde una mezcla heterogénea de fluido de cultivo de tejido que comprende:

(a) producir mediante proceso de fermentación por perfusión continua una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea que contiene una proteína de interés;

(b) transferir la mezcla de fluido del cultivo de tejido a un proceso de extracción de partícula continuo integrado con el sistema de fermentación por perfusión continua;

(c) extraer los contaminantes de partículas desde el fluido de cultivo de tejido en el proceso de extracción de partícula continuo para producir un fluido de cultivo de tejido clarificado que contiene la proteína de interés;

(d) transferir el fluido de cultivo de tejido clarificado a un recipiente de onda integrado con el proceso de extracción de partícula continuo; y

(e) purificar la proteína de interés desde el fluido de cultivo de tejido clarificado en el sistema de purificación para producir un producto parcialmente purificado, concentrado, libre de partícula y estéril que contiene la proteína de interés;

caracterizado porque el promedio de flujo específico de la mezcla a través del proceso de fermentación por perfusión continua y el proceso de extracción de partícula continuo se mantiene sustancialmente constante.

La presente invención además se dirige a un aparato para separar una proteína de interés de la mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea. En un aspecto de la invención, el aparato comprende: (a) sistema de fermentación por perfusión

continua; (b) un sistema de extracción de partícula continua integrada con el sistema de fermentación por perfusión; y (c) un sistema de purificación continua integrado con el sistema de extracción de partícula, caracterizado porque el aparato se adapta para mantener condiciones estériles.

En otro aspecto de la invención, el aparato comprende: (a) sistema de fermentación por perfusión continua; (b) un sistema de extracción de partícula continua integrado con el sistema de fermentación por perfusión; y (c) un sistema de purificación intermitente integrado con el sistema de extracción de partícula, caracterizado porque el aparato se adapta para mantener condiciones estériles.

El sistema de purificación puede, por ejemplo, ser un sistema de ultrafiltración o un sistema de absorción/ desorción convectiva, o cualquier otro sistema capaz de purificar o parcialmente purificar una proteína de interés desde una mezcla heterogénea en un sistema integrado, continuo o semicontinuo, estéril como se describe en la presente.

El proceso y aparato de la invención se adaptan para permitir el procesamiento continuo de una mezcla de fluido heterogénea, como por ejemplo un fluido de cultivo celular, en un

promedio de flujo sustancialmente constante. En un aspecto particular de la invención, el proceso y aparato de la invención se adaptan para el permitir procesamiento continuo de una célula heterogénea o mezcla de fluido de cultivo de tejido en un promedio de flujo sustancialmente constante debajo del punto de transición de la proteína en la región dependiente de presión del flujo versus la curva de TMP durante un periodo continuo y durante todo el proceso de purificación.

Estos y otros aspectos de la invención se describen en detalle a continuación en la siguiente memoria descriptiva de dicha invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras que acompañan, que se incorporan y constituyen parte de la memoria descriptiva, ilustran incorporaciones de la invención, y, junto con la descripción detallada de la incorporación, sirven para explicar los principios de la invención y sus beneficios.

FIG 1: Representación esquemática del proceso de perfusión continuo convencional seguido por 3 pasos de proceso de

aislamiento segregado física y logísticamente (recolección de cosecha en serie, extracción de partícula en serie y concentración/ purificación en serie).

FIG 2: Representación esquemática de 2 incorporaciones de un dispositivo inventivo A para fabricación estéril, integrada y continua. Representación esquemática de la incorporación A1 mostrada en el lateral izquierdo y representación esquemática de la incorporación A2 mostrada en el lateral derecho.

FIG 3: Representación esquemática de 2 incorporaciones del dispositivo inventivo B para fabricación estéril, integrada y continua. Representación esquemática de incorporación B1 mostrada en el lateral izquierdo y representación esquemática de la incorporación B2 mostrada en el lateral derecho.

FIG 4: Representación esquemática de la incorporación del sistema inventivo de extracción de partícula continua integrada (100), un elemento del dispositivo inventivo A y del dispositivo inventivo B.

FIG 5: Representaciones esquemáticas de las incorporaciones adicionales del dispositivo inventivo A que combina elementos

múltiples para aumentar la capacidad de planta total (A3) o el rendimiento de concentración y separación (A4).

FIG 6: Representaciones esquemáticas de incorporaciones adicionales del dispositivo inventivo B.

FIG 7: Incorporación adicional de dispositivos inventivos que combinan los elementos del dispositivo A y dispositivo B en serie para aumentar el rendimiento de la concentración total y separación.

FIG 8: Comparación ejemplo de las capacidades de carga total por 10" de cápsula de filtro para procesos en serie convencionales e incorporación del dispositivo inventivo y método para extracción de partícula continua (procesos de filtración continua integrada) utilizando cápsulas de filtro comercial idénticas. Método ejemplo que produce Factor VIII recombinante de coagulación mostrado.

FIG 9: Ejemplo de curva de presión- flujo (flujo de permeato específico en LMH= litros/ hora/ m^2 sobre presión transmembrana) y determinación de punto de operación. El círculo muestra el punto de operación típico que se ajustará mediante TMP para

procesos en serie convencionales. El rectángulo muestra la región operacional preferida que se ajustará mediante la bomba de permeato según el método para utilizar el dispositivo inventivo A.

FIG 10: Ejemplo de distribución de tiempo de residencia y tiempo de residencia medio del sistema UF continuo integrado (300) según el método para utilizar el dispositivo inventivo A. Medido para el sistema continuo descartable con módulo de 290 cm² (62,5 cm de longitud), 120 LMH de flujo cruzado, 0,2 LMH de flujo de retención, 2 LMH de flujo de permeato.

FIG 11: Ejemplo de separación de rFVIII desde fermentación por perfusión continua libre de plasma- proteína utilizando una incorporación del dispositivo inventivo A. Comparación del rendimiento de aislamiento promedio de un método continuo inventivo comparado con el rendimiento promedio de aislamiento en serie, incluyendo una propagación de desviación estándar. 3 series consecutivas se utilizaron para determinar el rendimiento en serie, mientras que 3 puntos consecutivos (días) se utilizaron para el proceso continuo.

FIG 12: Ejemplos de rendimiento del paso inventivo A. La presión transmembrana y el flujo específico de sistema de ultrafiltración continua integrada (300) como una función del tiempo de proceso continuo para 3 ejemplos diferentes mostrados. Triángulos = 100 kD de membrana, Factor VIII recombinante de coagulación (rFVIII); Cuadrados= 10 kD de membrana, interleucina -2 recombinante; Círculos= 50 kD de membrana, glicoproteína creado por ingeniería genética ($M_r > 100$ kD). Todos los ejemplos mostrados son fermentación por perfusión continua libre de plasma proteína.

FIG 13: Ejemplo de rendimiento a largo plazo del dispositivo inventivo A directamente acoplado para la fermentación por perfusión continua de los 2 productos proteicos que co expresan línea celular (proteína fluorescente verde GFP y IL-2SA). Presión de transmembrana y flujo específico de sistema de ultrafiltración continua inventiva (300) como una función del tiempo del proceso continuo mostrado. 10kD de membrana se utilizaron.

FIG 14: Ejemplo de rendimiento a largo plazo del dispositivo inventivo A directamente acoplado para la fermentación por perfusión continua de los 2 productos proteicos que co expresan línea celular (proteína fluorescente verde GFP y IL-2SA). 10kD de

membrana se utilizaron. El factor de concentración de ambos productos proteicos, como se determina mediante los ensayos específicos, y factor de concentración volumétrica mostrado como una función de tiempo de proceso continuo.

FIG 15: Ejemplo de rendimiento del dispositivo inventivo B. Rendimiento y caída de presión sobre cerca de 100 ciclos de adsorción/ desorción con el adsorbedor convectivo (proteína objetivo: variante de Factor FVIII de coagulación producido con ingeniería genética; adsorbedor convectivo: adsorbedor comercial, Mustang Q, Pall Corporation).

FIG 16: Ejemplo de rendimiento del dispositivo inventivo B. UV y perfil de conductividad durante un ciclo de adsorción / desorción típica con el adsorbedor convectivo (proteína objetivo: variante de Factor FVIII de coagulación producido con ingeniería genética; adsorbedor convectivo: adsorbedor comercial, Mustang Q, Pall Corporation).

FIG 17: Ejemplo de rendimiento de dispositivo inventivo B, gel SDS- Page (mancha con color plata) de Carga = cosecha clarificada continuamente dejando el sistema de extracción de partícula (100) y semi continuamente cargada en el sistema del

adsorbedor convectivo (400) y levigación de adsorción / desorción típica mostrada. Proteína objetivo: variante de Factor de coagulación de FVIII producida por ingeniería genética; adsorbedor convectivo: adsorbedor comercial, Mustang Q, Pall Corporation). La levigación se diluyó nuevamente para cargar concentración antes de realizarla sobre gel.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Excepto como se define expresamente en la presente, la terminología utilizada en la presente solicitud es estándar en el arte. Las siguientes definiciones de ciertos términos se proporcionan en la presente para asegurar la claridad y definiciones del significado de las reivindicaciones.

Unidades, prefijos, y símbolos pueden ser denotados en su forma aceptada SI. Los campos numéricos recitados en la presente están incluidos de los números que definen el campo e incluyen y respaldan cada entero en el campo definido. A menos que se note lo contrario, los términos "un" , "unos" se construyen como significado de "al menos uno de". Los encabezamientos de la

sección utilizada en la presente se encuentran con motivos organizacionales y no pretenden limitar el objeto descrito. Todos los documentos, o partes de documentos, citados en la presente solicitud, incluyendo pero sin limitar patentes, solicitudes de patentes, artículos, libros, y tratados, se incluyen expresamente en la presente por referencia en su totalidad por cualquier propósito.

El término "**clarificación**" y "**clarificado**" significa la extracción de la partícula desde una solución de manera que la solución remanente pase a través de 0,2 μm de membrana.

El término "**fermentación por perfusión continua**" se refiere a un sistema o proceso de fermentación de estado firme que opera sin interrupción y en el cual las células o microorganismos se mantienen en cultivo en la fase de crecimiento exponencial mediante la adición continua del medio fresco que se equilibra mediante la extracción de la suspensión celular desde el bioreactor.

Los términos "**cultivando**" "**creciendo**", "**manteniendo**", "**respaldando**" y "**expandiendo**" son sinónimos en el sentido de que las células permanecen viables y capaces de producir progenie.

El término "**concentración**", en su forma verbal, significa extracción de agua desde una solución de manera que la cantidad de una molécula de interés por volumen de solución remanente aumenta.

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

El término "**continuo**" significa ininterrumpido en tiempo, secuencia y/o operación durante períodos prolongados. Como se utiliza en referencia con la fermentación, procesos de clarificación y filtración de la presente invención, "continuo" significa que los procesos se integran física y logísticamente como para permitir la operación sin interrupción durante un periodo prolongado suficiente para producir un producto aislado parcialmente purificado, estéril, libre de partículas y concentrado que contiene la proteína de interés. El término continuo, como se utiliza en referencia a los procesos de la invención, se entiende además que significa un proceso que no se realiza en serie o de manera verdaderamente continua. Los

procesos de la presente invención son capaces de tener operación continua, por ejemplo, durante periodos prolongados que oscilan entre 1 día a varios meses sin interrumpir la operación o secuencia de los procesos. Como se utiliza en la presente invención, los procesos se operan durante un periodo continuo mayor a 2, 3, 4, 5, 6, ó 7 días, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ó 8 semanas, o 3, 4, 5, 6, o más meses.

Los términos "**semicontinuo**" e "**intermitente**" significa que uno o mas procesos o elementos de un sistema integrado operan de manera discontinua o en serie, mientras que otros procesos o elementos del sistema integrado operan de manera continua. Por ejemplo, en algunas incorporaciones de la invención, el proceso de purificación es un proceso de adsorción/ desorción convectiva, que comúnmente requiere de adsorción de la mezcla heterogénea de un sustrato de adsorción, eventualmente resultando en la saturación del sustrato, y la cual requiere terminación del proceso de adsorción y desorción o liberación de la fracción unida. Dicho proceso es intrínsecamente intermitente, aunque capaz de estar integrado con procesos de corriente ascendente que son continuos.

El término "**adsorción/ desorción convectiva**" significa un proceso cromatográfico en el cual sucede la transferencia de masa fundamentalmente mediante convección. La adsorción/ desorción convectiva es un proceso en el cual una fracción de una mezcla que contiene una molécula de interés se separa de otra fracción de la mezcla, mediante adsorción de una fracción a un sustrato seguido por desorción de aquella fracción desde el sustrato.

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

El término "**integrado**" como se utiliza en referencia a múltiples sistemas y/o procesos, significa que los sistemas y/o procesos se conectan física y logísticamente como para constituir un sistema unificado capaz de operar continuamente. En el contexto del sistema de la presente invención, que se dirige a un sistema continuo o semicontinuo integrado para producir una proteína de interés libre de partícula, concentrada y parcialmente purificada, un sistema integrado conectará diferentes componentes directamente de manera suficiente para mantener condiciones estériles entre los diferentes componentes del sistema.

Los términos "**medios**" (plural) y "**medio**" (singular) son sinónimos y se utilizan de manera intercambiable en la presente y el uso de una forma del término no implica la exclusión del otro.

El término "**mezcla**" significa una combinación heterogénea de moléculas y compuestos que contienen una molécula de interés, como por ejemplo, una proteína, y varios contaminantes. Una mezcla preferida de la presente invención es un fluido de cultivo de tejido comprendido por una mezcla heterogénea de proteínas que incluyen una proteína exógena de interés que se obtiene inicialmente desde un proceso de fermentación por perfusión continua.

El término "**capa de gel**" significa una delgada capa microscópica de moléculas que pueden formarse en la parte superior de una membrana. Puede afectar la retención de moléculas mediante obstrucción de la superficie de la membrana y de ese modo reduce el flujo del filtrado, o, en operación de flujo constante, aumenta TMP.

El término "**molécula de interés**" significa partículas u otra especie de moléculas que se separan de una solución o suspensión

en un fluido (por ejemplo, un líquido). Las partículas o moléculas de interés se separan del fluido, y, en la mayoría de los casos, de otras partículas o moléculas en el fluido. El tamaño de la molécula de interés a separarse determinará el tamaño del poro de la membrana a utilizarse. Preferentemente, las moléculas de interés son de origen biológico o bioquímico o producidas por procesos transgénicos o in vitro e incluyen proteínas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Ejemplos de orígenes de vapor de alimentación preferidos incluyen cultivo celular de mamífero y cultivo celular de microorganismo como por ejemplo, bacterias, hongos, y levadura. Debería notarse que las especies que se filtran incluyen péptidos no deseables, proteínas, componentes celulares, ADN, coloideos, micoplasma, endotoxinas, virus, carbohidratos, y otras moléculas de interés biológico, ya sea glicosilatados o no.

El término "**permeato**" se utiliza como sinónimo de filtrado.

El término "**producto aislado**" significa un producto parcialmente purificado y concentrado que contiene una proteína de interés. Un producto aislado es un producto que ha logrado un grado de purificación y concentración comparable con el logrado mediante proceso de ultrafiltración o adsorción / desorción

convectiva. Un producto aislado no es necesariamente homogéneo, pero será sustancialmente purificado en relación con el producto total inicial producido por el proceso de fermentación.

El término "**promedio de flujo específico**" se utiliza de manera intercambiable con el término "flujo del filtrado" ya que se relaciona con el filtrado. El promedio de flujo retenido específico es el promedio de flujo de retención normalizado en la membrana utilizada.

Cuando se utiliza en relación con el flujo, el término "**sustancialmente constante**" significa que el flujo se mantiene a un nivel generalmente constante durante un periodo sustancial durante el curso de la filtración.

El término "**fluido de cultivo de tejido**" significa una mezcla heterogénea de componentes derivados de un medio de cultivo de tejido. En los aspectos preferidos de la invención, el fluido de cultivo de tejido deriva de un proceso de fermentación por perfusión continua. Un fluido de cultivo de tejido "clarificado" es un fluido de cultivo de tejido que ha sido filtrado previamente para extraer desechos celulares y otras macromoléculas grandes.

Como se señalara en la página 9, el término "**presión de transmembrana**" y su sigla "TMP" significa la presión promedio aplicada desde la alimentación al lateral de filtrado de la membrana. TMP se calcula mediante $TMP[barra] = [(PF + PR)/2] - Pf$ donde PF es la presión de alimentación, PR es la presión de retención, y Pf es la presión del filtrado.

El término "**recuperación**" significa una cantidad de una molécula de interés que puede recuperarse luego del proceso. Usualmente expresado como un porcentaje del material inicial o rendimiento.

El término "**retención**" significa la parte de la muestra que no pasa a través de la membrana, también conocido como el concentrado.

El término "**ultrafiltración**" significa una forma de filtración que utiliza membranas de microporos o semipermeables para preferentemente separar fluidos e iones sobre la base del tamaño diferencial o peso molecular. La ultrafiltración comúnmente se utiliza para filtrar moléculas que tienen un peso molecular mayor a aproximadamente 10.000 daltones.

La presente invención se dirige a un proceso integrado, continuo y estéril que comprende fermentación por perfusión continua, extracción de partículas y purificación/ concentración. En un aspecto de la invención, el proceso comprende filtrar la mezcla de cultivo de tejido mediante un proceso de separación que selectivamente separa la proteína de interés de la mezcla en un punto establecido operacional debajo del punto de transición de la proteína en la región dependiente de presión del flujo versus la curva de TMP para producir un producto aislado, estéril, libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado, donde el promedio de flujo específico a través del proceso de separación se mantiene sustancialmente constante a niveles menores que el punto de transición de la proteína.

En otro aspecto de la invención, el proceso es un proceso continuo que comprende: (a) producir continuamente mediante fermentación por perfusión continua una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea que contiene una proteína de interés; (b) transferir continuamente la mezcla del fluido de cultivo de tejido a un proceso de extracción de partícula integrado con el sistema de fermentación por perfusión continua; (c) extraer continuamente los contaminantes del precipitado del

fluido de cultivo de tejido en el proceso de extracción de partícula para producir continuamente un fluido de cultivo de tejido clarificado que contiene la proteína de interés; (d) transferir continuamente el fluido de cultivo de tejido clarificado a un proceso de purificación integrado con el sistema de extracción de partícula; y (e) separar continuamente la proteína de interés del fluido de cultivo de tejido en el sistema de purificación para producir continuamente un producto aislado estéril, libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado que contiene la proteína de interés.

En inclusive otro aspecto de la invención, el proceso es un proceso semicontinuo que comprende: (a) producir continuamente mediante fermentación por perfusión continua una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea que contiene una proteína de interés; (b) transferir continuamente la mezcla del fluido de cultivo de tejido a un proceso de extracción de partícula integrado con el sistema de fermentación por perfusión continua; (c) extraer continuamente los contaminantes del precipitado del fluido de cultivo de tejido en el proceso de extracción de partícula para producir continuamente un fluido de cultivo de tejido clarificado que contiene la proteína de interés; (d) transferir continuamente el fluido de tejido de cultivo clarificado al recipiente de onda integrado con el proceso de

extracción de partícula; (e) transferir intermitentemente el fluido de cultivo de tejido clarificado a un proceso de purificación integrado con el recipiente de onda y (e) separar continuamente la proteína de interés del fluido de cultivo de tejido en el sistema de purificación para producir continuamente un producto aislado estéril, libre de partículas, concentrado y parcialmente purificado que contiene la proteína de interés, caracterizado porque el promedio de flujo específico de la mezcla a través del proceso de fermentación por perfusión continua y proceso de extracción de partícula continua se mantiene sustancialmente constante, y en un promedio igual a la producción promedio en tiempo del proceso de purificación semicontinuo integrado.

Dispositivos para Practicar Métodos de la Invención

La presente invención además se dirige a un aparato para separar una proteína de interés de una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea. Generalmente, el aparato comprende: (a) un sistema de fermentación por perfusión continua; (b) un sistema de extracción de partícula continua integrado con el sistema de fermentación por perfusión; y (c) un sistema de purificación continua integrado con el sistema de extracción de

partícula, caracterizado porque el aparato está adaptado para mantener las condiciones estériles. En otro aspecto de la invención, el aparato comprende: (a) un sistema de fermentación por perfusión continua; (b) un sistema de extracción de partícula continua integrado con el sistema de fermentación por perfusión; y (c) un sistema de purificación intermitente integrado con el sistema de extracción de partícula, caracterizado porque el aparato está adaptado para mantener las condiciones estériles. El sistema de purificación puede, por ejemplo, ser un sistema de ultrafiltración o un sistema de desorción / adsorción convectiva, o cualquier otro sistema capaz de purificar o purificar parcialmente una proteína de interés desde una mezcla heterogénea en un sistema integrado, continuo o semicontinuo, estéril como se describe en la presente.

El proceso y aparato de la invención se adaptan para permitir procesamiento continuo de una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogéneo en un promedio de flujo sustancialmente constante. En un particular aspecto de la invención, el proceso y aparato de la invención se adaptan para permitir el procesamiento de una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogéneo en un promedio de flujo sustancialmente constante debajo del punto de transición de la proteína en la

región dependiente de presión del flujo versus la curva de TMP durante un periodo continuo y a través del proceso de purificación.

En incorporaciones específicas, la invención proporciona dos dispositivos nuevos (A, B) que se componen de 3 elementos distintos pero altamente integrados, todos tienen un rol esencial y juntos forman una plataforma de sistema de aislamiento de proteína continuo, excepcionalmente eficaz que resuelve los problemas del arte previo anteriormente mencionados.

Los tres elementos distintos de cada dispositivo son en primer lugar un sistema de extracción de partículas continua (100), en segundo lugar un recipiente de onda estéril (200) y en tercer lugar un sistema de concentración / purificación integrado (300, 400, respectivamente). Todos estos tres elementos y así los nuevos dispositivos y métodos desarrollados para utilizar estos dispositivos se describen en detalle en la presente.

Para proporcionar purificación/ concentración continua o semicontinua integrada del producto proteico, el dispositivo inventivo A (de los cuales se muestran dos incorporaciones en la Figura 2) comprende un sistema de ultrafiltración estéril,

continuo integrado (300) mientras que el dispositivo inventivo B (de los cuales 2 incorporaciones se muestran en la Figura 3) comprende un sistema de adsorción / desorción convectiva semicontinuo integrado (400).

Los dispositivos de la invención se integran directamente con uno o mas fermentadores por perfusión continua y así forman una plataforma de fabricación integrada, continua, nueva.

DISPOSITIVO A

Sistema de Extracción de Partícula Continuo Integrado (100)

La Figura 2 muestra 2 incorporaciones del dispositivo inventivo A. El sistema de extracción de partícula continuo integrado (100) se conecta directamente con el lateral de cosecha del sistema de fermentación por perfusión continua (1).

La Figura 4 muestra una representación esquemática mas detallada de una incorporación del sistema de extracción de partículas continuo integrado inventivo (100) que está formado por una bomba (101), un indicador de presión o transmisor,

respectivamente (107), un colector de conexión (102) y un montaje de varios trenes de filtros (103). Todos los componentes se conectan con una tubería flexible y/o cañería dura.

La bomba (101) es una bomba peristáltica convencional que permite bombear suavemente la cosecha del cultivo celular sin rotar partes o sellos que se contactan con el producto estéril. La bomba y la tubería de la bomba tienen un tamaño dado para entregar el promedio de flujo de la cosecha deseado del sistema de fermentación de cultivo celular, que es hasta 15 volúmenes de bioreactor por día, por ejemplo, hasta 9,4 litros/ hora para un fermentador de 15 litros y hasta 125 litros / hora para un fermentador de 200 litros.

El indicador de presión o transmisor de presión (107) está diseñado de manera tal que puede estabilizarse mediante autoclave o irradiación. En el diseño actual, se utiliza ya sea un transmisor piezoresistivo reutilizable en un alojamiento de acero inoxidable o un indicador de presión de acero inoxidable reutilizable. Sin embargo, futuras mejoras pueden incluir el uso de transmisores descartables que pueden ser fácilmente esterilizados mediante irradiación.

En una presente incorporación de colector de conexión (102) está formado por una tubería flexible, con pinzas de tubería (o válvulas) y conectores estériles adecuados para permitir la conexión de montajes de tren de filtro adicionales sin comprometer la esterilidad del sistema. Preferentemente, los diámetros de tubería tienen un tamaño como para proporcionar velocidades de fluido lineales de aproximadamente 2 m/s o menores en promedios de flujo deseados, así evitando altas presiones y recortes. En otra presente incorporación, en lugar de conectores estériles se usan piezas de tubería flexible especial que pueden soldarse con soldadores de tuberías comerciales sin comprometer la esterilidad. Dichas piezas de tuberías se realizan con PVC u otros polímeros adecuados.

El montaje de tren de filtro (103) está formado por al menos dos, preferentemente múltiples trenes de filtros idénticos (como se muestra en representaciones esquemáticas) con solamente uno de los trenes de filtro abiertos en cualquier momento, como se muestra en el ejemplo de la Figura 4 (105).

Cada tren de filtro está formado por al menos un filtro, preferentemente un prefiltro y un filtro final en serie (como se muestra en la Figura 4). Si se quiere aumentar la capacidad de

una aplicación específica, cada tren de filtro (105, 106 etc) puede también estar formado de múltiples filtros o trenes de filtro en paralelo (no mostrado).

En una incorporación de la invención mostrada en la Figura 4, el segundo tren de filtro del montaje (106) se cierra mediante un disco de ruptura sensible a la presión, o una clavija de ruptura, respectivamente (104). En funcionamiento, la función del disco de ruptura o la clavija de ruptura, es automáticamente abrir el paso del flujo al segundo tren de filtro (107) una vez que la presión en el primer tren de filtro (105) alcance un límite específico, así asegurando continuación ininterrumpida del proceso de filtración. Discos de ruptura comercialmente disponibles se utilizan en el sistema inventivo, que son de otra manera utilizados para proporcionar liberación de presión de seguridad. En una presente incorporación, los discos de ruptura o clavijas de ruptura con un límite de presión de ruptura específico o no más de 110,3 KPa (16 PSI) se utilizan, los cuales prueban ser muy eficaces. Sin embargo, un registro límite de presión especificada es posible.

Cada tren de filtro adicional del montaje de tren de filtro también se separa mediante una válvula manual o automática y otro

disco de ruptura o clavija de ruptura. Una vez que el segundo tren de filtro (106) está en funcionamiento, la válvula del siguiente disco de ruptura o clavija de ruptura, respectivamente, se abre, de manera tal que el siguiente tren de filtro pueda actuar como respaldo, etc.

En una incorporación alternativa, las válvulas accionadas automáticamente se utilizan exclusivamente, y en funcionamiento, un sistema de control acciona las válvulas basados en el aporte del sensor de presión piezoresistivo (107) que puede ser esterilizado mediante autoenclave. Sin embargo, los solicitantes descubrieron que el presente diseño que comprende el disco de ruptura o clavija de ruptura, respectivamente, proporciona impresionante solidez en el funcionamiento a largo plazo.

El promedio final del filtro es al menos 3 μm o menor, preferentemente 0,45 μm y aun mas preferentemente 0,2 μm . El tren de filtro en funcionamiento (6) además retiene las células remanentes, así como también, desechos celulares importantes y otras partículas, resultando en una corriente de salida libre de partículas (9), el fluido de cultivo de tejido clarificado (cTCF).

Diferentes materiales de filtros disponibles comercialmente pueden ser utilizados. En el presente diseño, las cápsulas de filtros descartables se utilizan, como por ejemplo, Sartopure o cápsulas de prefiltro Sartoclear (Sartorius, Goettingen) y cápsulas de filtro final Sartoban (Sartorius, Goettingen), que pueden ser esterilizadas mediante autoenclave o irradiación.

Como un ejemplo de una presente incorporación del dispositivo inventivo, diseñado para un promedio de flujo de 1 litro/ minuto, cada tren de filtro (105, 106, etc) del montaje (103) está formado por 3 30'' cápsulas de prefiltro (Kleenpak Ultipleat, Pall Corp., 4,5 μm , 0,75 m^2 cada uno) seguido por 3 20'' cápsulas de filtro final (Sartobran P, Sartorius, 0,45 μm /0,2 μm , 1,3 m^2 cada uno). Esta incorporación particular ha demostrado ser particularmente eficaz para fabricación en gran escala de Factor de coagulación recombinante FVIII, así como también, variantes de FVIII producido mediante ingeniería genética incluyendo FVIII de dominio B borrado.

Sin embargo, los solicitantes han descubierto que cuando se utiliza el dispositivo y método inventivo, la eficacia de la extracción de partículas con una variedad de materiales de filtros disponibles y configuraciones de diferentes fabricantes

(Pall, Sartorius, Cuno) aumenta consistente y significativamente en comparación con los procesos en serie respectivos convencionales.

Además, el dispositivo y proceso nuevos inventivos serán beneficiosos para el uso con los nuevos tipos de filtros y geometrías, por ejemplo, con tipos de filtros que aumentan el área de filtro disponible por cápsula, así como también, con tipos de filtros que proporcionan un modelo de flujo cruzado u otros medios para minimizar la construcción de tortas, como por ejemplo vibración o rotación del elemento de filtro.

En otra incorporación del proceso inventivo, el montaje de tren de filtro (103) comprende solamente un tren de filtro de refuerzo estéril cerrado por un disco de ruptura o clavija de ruptura, respectivamente, pero inclusive múltiples trenes de filtros para el funcionamiento. Este primer tren de filtro del montaje opera hasta que un volumen de carga predeterminado específico ha sido procesado, luego de dicha operación se intercambia (manual o automáticamente) hasta el siguiente tren de filtro en el montaje. El volumen de carga específico es especificado de manera tal que bajo condiciones de funcionamiento normales el límite de presión el disco de ruptura o la clavija de

ruptura no se excede. Sin embargo la presión aumenta mas que lo usual durante la filtración, por ejemplo, debido a una inusual filtración baja de la cosecha, el tren de filtro de refuerzo asegura nuevamente que una filtración continua sin interrupciones abriendo una vez la presión especificada se excede. Siguiendo con la abertura del tren de filtro de refuerzo, la filtración se pasa a otro tren de filtro del montaje y otro tren de filtro de refuerzo con el disco de ruptura o clavija de ruptura instalada sin comprometer la esterilidad del sistema.

Los expertos en el tema saben que para mantener tanto los costos del filtro y los tiempos de procesamiento para procesos de extracción de partículas en serie al mínimo, los trenes de filtro tienen que tener un tamaño tal como para tener el área de filtro lo mas pequeña posible requerida para proporcionar el promedio de flujo absoluto deseado (en litros / hora) y presión máxima. El promedio de flujo absoluto deseado en cambio tiene que ser lo suficientemente alto como para proporcionar tiempos de procesamiento posibles para el volumen en serie deseado. Esto necesita intrínsecamente un alto promedio de flujo específico (en litros/ hora/ m^2 o área del filtro).

En oposición al sistema de filtración en serie optimizado comparable, el dispositivo inventivo está diseñado para varias

veces el promedio de flujo específico bajo, que se mantiene constante (en litros/ hora/ m² del área de filtro instalada) de manera tal que el promedio de flujo absoluto es igual al promedio de flujo de la cosecha de la fermentación por perfusión continua.

Los solicitantes inesperadamente descubrieron que en tales promedios de flujo específicos bajos, el volumen que puede ser procesado por un filtro es desproporcionalmente mayor que en promedios de flujo ajustados en procesos en series.

Es importante notar que en procesos de aislamiento en serie convencionales, tales promedios de flujo específicos bajos deberían no ser posibles debido a sus áreas extremas de filtración (y por ende, costos) o demasiados bajos en un promedio de flujo absoluto. Esto es en primer lugar porque la mayoría del tiempo, el equipo de extracción de partícula en serie no trabaja mientras que la cosecha se recoge para la siguiente serie. Además, el sorpresivo desproporcional aumento en la capacidad alcanzable de filtro del método inventivo permite una importante reducción en el consumo de filtro y así en los costos de fabricación.

Recipiente de onda (200)

La salida del sistema de extracción de partícula continuo integrado se conecta directa y constantemente con un recipiente de onda (201), como se muestra en la Figura 2. Este recipiente de onda es un recipiente estéril, como por ejemplo, una bolsa descartable o un recipiente de acero inoxidable con al menos un puerto de entrada y un puerto de salida, este último preferentemente en la parte inferior del recipiente. Un campo amplio de tamaños y diseños de recipientes puede utilizarse. Sin embargo, el recipiente de onda tiene un tamaño preferentemente pequeño en comparación con el diseño volumétrico a través de todo el sistema para mantener el tiempo de residencia del producto en el recipiente al mínimo, es decir, debajo de 24 horas, preferentemente, debajo de 8 horas, y aun mas preferentemente debajo de 4 horas.

Los solicitantes descubrieron que tales tiempos de resistencia bajos del producto, únicamente posible debido a los dispositivos inventivos, permiten un aumento importante en el rendimiento para productos proteicos intrínsecamente inestables, así resolviendo uno de los problemas del arte previo.

En algunas incorporaciones de los dispositivos inventivos, el recipiente de onda se ubica en una célula de carga o equilibrio (202), como se muestra para el dispositivo B1 y B2 en la Figura 3. Esta célula de carga o equilibrio proporciona una señal de peso para un sistema de control computarizado (no mostrado).

Además, en una incorporación de dispositivos inventivos(B2), el recipiente amortiguador (204) se conecta mediante una bomba peristáltica (203) al recipiente de onda. En funcionamiento, esta estructura se ajusta a las propiedades de la corriente de cosecha libre de partículas, como por ejemplo, la conductividad (fuerza iónica) o pH, agregando un amortiguador o diluyente adecuado. En este caso, un sistema de mezcla opcional (205) y los sensores para controlar la condición deseada (206), como por ejemplo el pH o conductividad, se utilizan. En el presente diseño, un mezclador acoplado magnéticamente se utiliza; sin embargo, otros sistemas de mezcla, como por ejemplo batidores o dispositivos de pulsación podrían también ser utilizados.

Concentración/ purificación continua integrada (300)

Dispositivo A, del cual se muestran dos incorporaciones en la Figura 2, comprende un sistema de ultrafiltración estéril continua integrada (300). Las incorporaciones del sistema de ultrafiltración estéril continua comprende una bomba de reciclado (301) y un circuito de reciclado (306), uno o más módulos de ultrafiltración de flujo cruzado estéril (303), una bomba de permeato (305), un recipiente que recibe permeato estéril (307) en una célula de carga o equilibrio (309) y una bomba de retención (311). Además, comprende instrumentación en forma de un indicador de presión de entrada o un transmisor (302), el indicador de presión de permeato o transmisor (304), el indicador de presión de salida o transmisor (308), así como un medidor de flujo de reciclado (310). En funcionamiento, el sistema de salida (312) proporciona una corriente continua del producto proteico parcialmente purificado y concentrado que puede recogerse continuamente, congelarse o procesarse adicionalmente.

La incorporación inventiva A2 comprende además un amortiguador o recipiente diluyente (314), una bomba de adición de diluyente / amortiguador peristáltico (313), así como también, sensores a través de flujo para controlar el acondicionamiento del concentrado en el circuito de reciclado, como por ejemplo sensores para el pH y conductividad (315, 316). En

funcionamiento, esta estructura se utiliza para ajustar las propiedades de la corriente de cosecha libre de partículas, como por ejemplo conductividad (fuerza iónica) o pH, agregado amortiguador o diluyente adecuado. Esta estructura también puede utilizarse para agregar estabilizadores proteicos. Aunque en la incorporación inventiva A2 el circuito de reciclado actúa como una cámara mezcladora, el acondicionamiento puede alternativamente también realizarse agregando un recipiente de onda como se muestra para el dispositivo B (incorporación B2), comprendiendo componentes (203, 204, 205, 206) como se discutirá posteriormente en esta revelación (véase descripción del dispositivo B).

Las incorporaciones del dispositivo inventivo también comprenden un sistema de control programable y registros de datos, que registra las señales de datos que ingresan desde la instrumentación (por ejemplo, pero sin limitar, presiones, promedio de flujo, peso del recipiente, pH conductividad) y controles de las velocidades de la bomba de acuerdo con un algoritmo de control predefinido.

Todas las bombas (301, 305, 311, 313) son bombas peristálticas, que permiten bombear las respectivas bombas de

corrientes de fluidos sin rotar partes o sellos que contienen la corriente del producto estéril. Los solicitantes descubrieron que es preferible proporcionar un funcionamiento a largo plazo sólido, estéril. Sin embargo, otros diseños de bombas estériles pueden en principio utilizarse. La bomba de reciclado (301) y su tubería de bombas tiene un tamaño que permite un ajuste sólido de los promedios de flujo cruzado deseados de entre 80 a 800 litros / hora por m² del área de membrana instalada, dependiendo de las características de transferencia de masa del módulo de ultrafiltración utilizado. La bomba de permeato tiene un tamaño que permite ajuste sólido preciso de un flujo de permeato específico de entre 90% a 99% del promedio de flujo de cosecha desde una fermentación por perfusión continua. La bomba de retención tiene un tamaño para permitir un ajuste sólido y preciso del flujo de retención entre 1% y 10% del promedio de flujo de cosecha desde la fermentación por perfusión continua.

Los módulos de ultrafiltración encapsulados (303) se utilizan para permitir un funcionamiento estéril sólido y se esterilizan mediante autoenclave o irradiación. El recorte del peso molecular nominal óptimo se elige basado en el peso molecular del producto proteico de interés y tiene que confirmarse mediante experimentos estándares conocidos por los

expertos en el área. Una variedad de materiales de membrana, como por ejemplo, polietersulfona, polietersulfona hidrofílica o celulosa regenerada puede utilizarse, siempre que todo el módulo de la membrana pueda esterilizarse mediante irradiación y/o autoenclave sin dañar la membrana. Se espera que los materiales hidrofílicos puedan aumentar la eficacia debido a su baja tendencia contaminante.

Los solicitantes descubrieron que el dispositivo A es eficiente únicamente si el área en metros cuadrados de membrana de ultrafiltración total instalada es igual al campo entre 0,1 a 2 veces el promedio de flujo volumétrico de la cosecha desde la fermentación por perfusión continua en litros / hora. Por ejemplo, para un promedio de flujo de cosecha por perfusión de 1 litro/ hora, el área de membrana total instalada debería ser entre 0,1 y 2 metros cuadrados. Los solicitantes descubrieron que el dispositivo A es aun mas eficaz, si el área en metros cuadrados de membrana de ultrafiltración total instalada es igual al campo entre 0,3 a 1 vez el promedio de flujo volumétrico de la cosecha desde la fermentación por perfusión continua en litros / hora.

En una incorporación de la invención, se utilizan módulos de membrana de fibra hueca "descartable" disponible comercialmente (GE Healthcare, ex Amersham Biosciences). Sin embargo una variedad de membranas encapsuladas y diseños de módulos pueden utilizarse, como por ejemplo módulos de herida espiral, cassettes encapsulados o cápsulas con transferencia de masa aumentada debido a modelos de flujo secundarios (por ejemplo, flujo de vórtice), elementos giratorios (por ejemplo, filtros de disco dinámico) o filtros vibratorios. Se espera que los cassettes de ultrafiltración especialmente encapsulados pueden ser utilizados beneficiosamente en los dispositivos inventivos ya que proporcionan coeficientes de transferencia de masa altos a un promedio de flujo cruzado requerido relativamente bajo, así reduciendo la capacidad de la bomba, mientras que mantiene la complejidad del sistema y los costos de inversión bajos.

El dispositivo inventivo permite no solo un funcionamiento continuo sino también realmente estéril, en contraste con una simple operación aséptica. Los solicitantes descubrieron esto diseñando todos los componentes del sistema contactando el producto para resistir no solamente a la limpieza, sino también a la esterilización mediante autoenclave o gamma-irradiación. En las presentes incorporaciones los módulos encapsulados

descartables se utilizan para extraer partículas continuas (100), así como también, ultrafiltración continua (300). Las bombas peristálticas se utilizan para evitar cualquier contacto del producto con los elementos rotativos y los sellos mecánicos. Además, en las presentes incorporaciones, tubería descartable y montajes de bolsas se utilizan en lugar de cañerías duras. Los componentes que contactan productos descartables (por ejemplo, tubería, bolsas, módulos) o grupos de componentes se premontan y esterilizan juntos, así simplificando la estructura y funcionamiento. Los sistemas se diseñan para mantener cualquier abertura potencial del sistema estéril al ambiente (por ejemplo, gancho de flujo laminar), como para muestra, bolsa o intercambio de instrumentación a un mínimo. En presentes incorporaciones del dispositivo, los colectores se diseñan redundantes para permitir el intercambio desde un componente estéril (por ejemplo, bolsa receptora del producto) al siguiente sin abertura. El intercambio adicional de la tubería, módulos o bolsas se realiza preferentemente utilizando soldadores de tubería estéril antes que conectores estériles.

Otras incorporaciones de los dispositivos podrían además comprender componentes como por ejemplo recipientes de acero inoxidable, alojamientos de filtro o tuberías que pueden ser

esterilizadas in situ, solo o en combinación con los componentes descartables, siempre que la solidez y esterilización en el funcionamiento a largo plazo se aseguren.

Las incorporaciones del dispositivo inventivo A se diseñan para procesar el material desde fermentadores múltiples en plantas de fabricación más grandes (A3). Un ejemplo se muestra en la representación esquemática en la Figura 5. Otras incorporaciones se diseñan para aumentar el factor de concentración total y el rendimiento de separación combinando 2 etapas de los sistemas de ultrafiltración continua (300) en series (A4 mostrado esquemáticamente en la Figura 5).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO PARA UTILIZAR EL DISPOSITIVO A

Las fermentaciones por perfusión continua se realizan sobre un período prolongado (una campaña), comúnmente entre 2 semanas y 6 meses o mas. El producto que contiene el fluido de cultivo de tejido (TCF), las células y los desechos celulares se procesa continuamente utilizando el dispositivo A. Una corriente de producto purificado parcialmente y concentrado (el "producto aislado") se produce y deja continuamente el dispositivo en su salida (312). Utilizando la bomba (101) del sistema de extracción

de partícula estéril, continua (100) la cosecha se bombea continuamente a través del montaje de filtración (103) en un promedio de flujo de cosecha por perfusión deseada Q_h de la fermentación.

La corriente de salida del sistema de filtración continua, es decir, el fluido de cultivo de tejido clarificado (cTCF) entra continuamente en el recipiente de onda (201). Desde el recipiente de onda el cTCF se procesa continuamente mediante un sistema de ultrafiltración estéril (300) en un promedio de flujo igual al promedio de flujo que viene de la fermentación por perfusión continua. Debido al pequeño tamaño del recipiente de onda en relación con los promedios de flujo ajustados, el tiempo de residencia medio del producto en el recipiente se mantiene en un mínimo, es decir, debajo de 12 horas, preferentemente debajo de 4 horas y aun mas preferentemente debajo de 2 horas.

El flujo cruzado adecuado y así la transferencia de masa se ajusta en el módulo de ultrafiltración mediante la bomba de reciclado (301). El promedio de flujo de retención se ajusta y controla utilizando la bomba de retención (311), así proporcionando un promedio de flujo Q_i continuo y constante del producto aislado concentrado dejando al dispositivo A en su

salida (312). La bomba de permeato (305) se usa para ajustar y controlar el promedio de flujo Q_p del permeato, que se extrae continuamente del permeato de los módulos de ultrafiltración, y que está formado por agua y componentes de solución suficientemente pequeñas como para pasar a través de la membrana de ultrafiltración (por ejemplo, sales, proteínas pequeñas).

Los promedios de flujo de permeato (Q_p) y retención/ aislado (Q_i) se ajustan cuidadosamente y se controlan para combinar el promedio de flujo de cosecha Q_h de la fermentación de manera tal que:

$$Q_p + Q_i = Q_h$$

Al mismo tiempo, los promedios de flujo se ajustan y se controlan de manera tal que un factor de concentración deseado cf se logra satisfaciendo:

$$Q_i = 1/cf * Q_h$$

Por ejemplo, para lograr una factor de concentración de producto deseado de 10 veces en el producto aislado sobre la concentración de cosecha inicial, Q_i se controla en $Q_i = 1/10 * Q_h$

utilizando la bomba de retención/ aislamiento (311) mientras que Q_p se controla en $Q_p = 0,9 * Q_h$ utilizando la bomba de permeato (305).

Dado que estos promedios de flujo de salida se controlan mediante las bombas (305) y (311), el sistema de ultrafiltración automáticamente extrae un flujo de $Q_p + Q_i$ desde un pequeño recipiente de onda (201).

En el caso de utilizar la incorporación A2 (véase Figura 2 lateral derecho), una corriente estéril del amortiguador o agua para inyección desde el recipiente 314 se agrega al sistema de ultrafiltración continuo continuamente en un promedio de flujo constante Q_b utilizando la bomba de adición amortiguadora (313). Además, las condiciones del producto aislado pueden libre y continuamente ajustarse, por ejemplo, en términos de fuerza iónica, pH, adición de estabilizadores, etc. Los promedios de flujo se controlan además en

$$Q_p + Q_i = Q_h + Q_b$$

Además, las proporciones de promedio de flujo pueden elegirse de manera tal que un factor de concentración deseada cf se logra satisfaciendo $Q_i = 1/cf * (Q_h + Q_b)$. Alternativamente,

este proceso puede utilizarse para solamente alterar condiciones (por ejemplo, pH, conductividad), estableciendo $Q_i = Q_h + Q_b$.

El método nuevo para utilizar el dispositivo A también contrasta con los procesos en serie UF (arte previo) en términos de punto de establecimiento operacional de la misma ultrafiltración. Los procesos UF en serie convencionales se diseñan para una cierta producción a través de un área de membrana bajo en un corto periodo. UF en serie es así generalmente operado en un punto de transición de presión dependiente a la región controlada de transferencia de masa (véase Figura 9). Esto lleva a un flujo específico inicial alto deseable, que sin embargo cae rápida y significativamente sobre el curso de segundos a minutos, cuando la polarización de concentración conduce rápidamente a una presión osmótica y la formación de una capa de gel limitante (membrana secundaria). Dicha concentración de pared alta de macromoléculas también conduce a una adsorción aumentada de compuestos a la superficie interna y externa de la membrana, es decir contaminando la membrana. Esta contaminación además reduce el flujo de permeato durante un tiempo.

Los solicitantes sorpresivamente descubrieron que con el dispositivo A, muchas veces las capacidades de carga mayores totales por área de membrana de ultrafiltración instalada se logran operando en el extremo bajo de la curva de presión - flujo (véase Figura 9):

La pared de concentración normalizada de un componente completamente retenido puede describirse de la siguiente manera:

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

Con

J= flujo de permeato específico en litros / hora/ m²

kd: coeficiente de transferencia de masa en litros/ hora/ m².

cvolumen= concentración del componente en el volumen de la solución

Como en UF en serie, UF continuo se opera en un coeficiente de transferencia en masa optimizado para minimizar la

polarización de concentración. Sin embargo, en contraste con la ultrafiltración en serie, los solicitantes ajustan el flujo de permeato J para que sea un extremo bajo de la curva presión-flujo (véase Figura 9). Como resultado de la relación exponencial, la pared de concentración c_p en la superficie de la membrana es además significativamente menor que lo que sería en la ultrafiltración en serie. Por ejemplo, la presente incorporación del método inventivo ajusta un flujo de permeato específico objetivo de aproximadamente $1/10$ del coeficiente de transferencia de masa alcanzable, así ajustando una concentración de pared de solamente 10% sobre la concentración de volumen ajustado (o retención).

La siguiente Tabla 1 muestra un ejemplo de un método para utilizar dispositivo A (incorporación A1) para el aislamiento continuo de un producto proteico desde un fermentador de escala de desarrollo:

Tabla 1

Ejemplo de método para utilizar una presente incorporación del dispositivo A para el aislamiento continuo de un producto proteico desde una fermentación por perfusión continua

Parámetro Opcional	Objetivo
Promedio de flujo de cosecha Qh desde una perfusión continua (controlado con bomba 101)	5 litros/ hora (120 litros / día)
Promedio de flujo de permeato QP (controlado con bomba 305)	4,75 litros/ hora
Retención (producto aislado) promedio de flujo Qi (controlado con bomba 311)	0,25 litros/ hora
Flujo de permeato específico J	2 litros/ hora/ m ²
Factor de concentración cf	20 veces

Para cada molécula de producto individual, un criterio puede definirse por una estructura de ultrafiltración continua estéril, por ejemplo, basado en la presión transmembrana. Una vez que se excede el límite de presión transmembrana, la estructura de ultrafiltración estéril continua se cambia con otra estructura idéntica sin comprometer la integridad y la esterilidad del sistema. Esto puede hacerse en analogía con la estructura de filtración estéril continua usando ya sea colectores o conectores estériles, o usando tuberías descartables flexibles y soldadores de tubería estériles.

DISPOSITIVO B

Sistema de extracción de partículas continuo integrado (100)

La Figura 3 muestra 2 incorporaciones del dispositivo inventivo B. El sistema de extracción de partícula continuo integrado (100) se conecta directamente con el lado de cosecha del sistema de fermentación por perfusión continua (1). Esta parte del dispositivo B es idéntica a la del dispositivo A (véase descripción detallada del dispositivo A y Figura 4, más arriba)

Recipiente de onda (200)

La salida del sistema de extracción de partícula continuo integrado se conecta directa y constantemente con un recipiente de onda (201), como se muestra en la Figura 3. Este recipiente de onda es un recipiente estéril, como por ejemplo, una bolsa descartable o un recipiente de acero inoxidable con al menos un puerto de entrada y un puerto de salida, este último preferentemente en la parte inferior del recipiente. Un campo amplio de tamaños y diseños de recipientes puede utilizarse. Sin embargo, el recipiente de onda tiene un tamaño preferentemente pequeño en comparación con la producción volumétrica a través del sistema para mantener el tiempo de residencia del producto en el recipiente al mínimo, es decir, debajo de 26 horas, preferentemente, debajo de 12 horas, y aun mas preferentemente debajo de 4 horas.

En el dispositivo B, el recipiente de onda se ubica en una célula de carga o equilibrio (202), como se muestra para incorporaciones B1 y B2 en la Figura 3. Esta célula de carga o equilibrio proporciona una señal de peso para un sistema de control computarizado (no mostrado).

Además, en una incorporación del dispositivo inventivo (B2), un recipiente amortiguador (204) se conecta mediante una bomba peristáltica (203) al recipiente de onda. En funcionamiento, esta estructura se ajusta a las propiedades de la corriente de cosecha libre de partículas, como por ejemplo, la conductividad (fuerza iónica) o pH, agregando componentes para modificar las propiedades del tejido clarificado cultivado recibido desde el sistema de extracción de partículas, como por ejemplo un amortiguador o diluyente o un estabilizador proteico adecuado. En este caso, una presente incorporación también comprende un sistema de mezcla opcional (205) y los sensores para controlar la condición deseada (206), como por ejemplo el pH o conductividad, se utilizan. En la presente incorporación, se utiliza un mezclador acoplado magnéticamente; sin embargo, otros sistemas de mezcla, como por ejemplo batidores o dispositivos de pulsación podrían también ser utilizados.

En otra incorporación del dispositivo inventivo, 2 recipientes de onda se utilizan. En un tiempo dado, un recipiente de onda conectado con sistema de extracción de partícula continuo (100), así recibiendo fluido clarificado, mientras que el otro se conecta con el sistema semicontinuo de concentración / purificación (400), así alimentando un ciclo de adsorción/

desorción convectiva. El intercambio entre ambos se realiza a través de un sistema de control, utilizando el peso del recipiente receptor para provocar un interruptor una vez que el volumen máximo de relleno se alcanza.

Concentración/ purificación semicontinua integrada (400)

Dispositivo B, del cual 2 incorporaciones se muestran en la Figura 3, comprende un sistema de adsorción/ desorción convectiva semicontinua integrada (400).

El sistema de adsorción/ desorción convectiva semicontinuo se diseña y tiene un tamaño tal como para que su promedio de flujo de carga (Q_{carga}) es significativamente mayor al promedio de flujo del proceso de filtración continua y cosecha por perfusión continua (Q_h), es decir $\text{Carga} \gg Q_h$.

Las incorporaciones del sistema de concentración / purificación semicontinua (400) comprende una bomba de carga

(401) , un montaje de válvula de puertos múltiples (402) y varios recipientes amortiguadores (404), una válvula de 3 direcciones (403) conectada con un recipiente receptor de desecho estéril (413) y uno o mas módulos de adsorción convectiva (406), conectores o transmisores de presión de entrada y salida (405, 408), instrumentación adicional como por ejemplo sensor UV (409), pH y sensores de conductividad (409, 410), medidor de flujo (412), así como también, otra válvula de 3 direcciones (407) conectada con el recipiente de desechos (413) y la salida de levigación del producto (414).

Las incorporaciones del dispositivo inventivo también comprenden un sistema de control programable y registros de datos, que registra las señales de datos (no mostrado) que ingresan desde la instrumentación (por ejemplo, pero sin limitar, presiones, UV, pH, conductividad, peso de recipiente de onda) y controles de las válvulas automatizadas y la bomba de acuerdo con los protocolos programados.

La bomba de carga (401) es preferentemente una bomba peristáltica para evitar un contacto directo de un producto o amortiguadores estériles con cualquier parte mecánica o de sellos. Los solicitantes descubrieron que es preferible

proporcionar un funcionamiento a largo plazo estéril firme. Sin embargo, otros diseños de bomba estéril pueden en principio ser utilizados. La bomba de carga tiene un tamaño que depende del volumen de matriz instalado del adsorbedor convectivo (406) para permitir un ajuste sólido de al menos 12 volúmenes de matriz / minuto. Por ejemplo, en una presente incorporación, se utilizan cápsulas de adsorbedor de membrana Mustang (Pall Corp) que tienen un volumen aproximado de 0,3 litros. Además, la bomba de carga tiene un tamaño que permite cargar los promedios de flujo de hasta 3,6 litros / minuto.

La función del montaje de válvula de múltiples puertos (402) es permitir el intercambio entre el producto que contiene la carga extraído del recipiente de onda (201) y cada uno de los amortiguadores estériles y soluciones de limpieza de los recipientes amortiguadores estériles (404). Las presentes incorporaciones del dispositivo B utilizan una serie de válvulas de perforación accionadas automáticamente que perforan la tubería flexible conectada con cada recipiente amortiguador desde el exterior para cerrar y abrir cada línea. Los solicitantes descubrieron que estas válvulas de perforación proporcionan una solución particularmente beneficiosa para el dispositivo B ya que permiten que cualquier producto se contacte y así no necesite ser

limpiado o esterilizado. Sin embargo, un amplio rango de válvulas adecuadas comerciales para el procesamiento estéril y conocidos para los expertos en la materia pueden ser utilizadas, como por ejemplo válvulas de membrana accionadas.

En la presente incorporación, las válvulas de 3 direcciones (403-407) son válvulas de membrana accionadas de forma autoclavable. Sin embargo, una variedad de válvulas comerciales adecuadas para el procesamiento estéril puede en principio ser utilizada, incluyendo por ejemplo, válvulas de perforación.

El módulo adsorbedor convectivo (406) contiene una matriz cromatográfica con una transferencia de masa convectiva predominantemente del producto de superficie de adsorción y en contraste con la cromatografía convencional, se esteriliza antes que se opere mediante autoenclave o irradiación. La transferencia de masa predominantemente convectiva permite, en contraste con la cromatografía de cama embalada convencional, muy bajos tiempos de ciclo de adsorción/ levigación/ regeneración, que los solicitantes utilizan en el dispositivo inventivo para realizar el funcionamiento semicontinuo.

En la presente incorporación del dispositivo inventivo, el adsorbedor convectivo (406) está formado por una o más cápsulas adsorbedoras de membrana comercialmente disponibles con una química intercambiable de ión (Mustang, Pall Corporation o Sartobind, Sartorius). Sin embargo, el dispositivo puede utilizar otros materiales adsorbedores de membrana y geometrías y matrices convectivas nuevas como por ejemplo matrices monolíticas, dado que en contraste con embalaje de resina por cromatografía convencional se elimina y las matrices pueden generalmente encapsularse en módulos listos para utilizar.

Además, otras químicas, incluyendo matrices de afinidad convectiva que comprenden específicos ligandos que unen productos además proporcionarán un rendimiento únicamente beneficioso en el dispositivo inventivo.

En una incorporación del dispositivo inventivo, los módulos adsorbedores convectivos múltiples se utilizan en el dispositivo en forma de un montaje de trenes- adsorbedores convectivos en paralelo, similar al sistema de extracción de partícula continuo (100). Todo el montaje con todos los adsorbedores- trenes para uno nuevo deberían primero alcanzar el fin de su vida útil, según se determina, por ejemplo, mediante un criterio predefinido como

por ejemplo presión durante carga o número máximo de ciclos de operación realizados. Cada absorbedor- tren está formado por ya sea un módulo individual o módulos adsorbedores convectivos múltiples en paralelo y/o en serie para aumentar la capacidad de unión y/o mejorar la utilización de capacidad.

Es importante destacar que el dispositivo inventivo permite no solo un funcionamiento continuo sino también realmente estéril, en contraste con una simple operación aséptica. Los solicitantes descubrieron esto diseñando todos los componentes del sistema contactando el producto para resistir no solamente a la limpieza, sino también a la esterilización mediante autoenclave o gamma- irradiación. En las presentes incorporaciones los módulos encapsulados descartables se utilizan para extraer partículas continuas (100), así como también, adsorción/ desorción convectiva estéril semicontinua (400). Las bombas peristálticas se utilizan para evitar cualquier contacto del producto con los elementos rotativos y los sellos mecánicos. Además, en las presentes incorporaciones tubería descartable y montajes de bolsas se utilizan en lugar de cañerías duras. Los componentes que contactan productos descartables (por ejemplo, tubería, bolsas, módulos) o grupos de componentes se premontan y esterilizan juntos, así simplificando la estructura y

funcionamiento. Los sistemas se diseñan para mantener cualquier abertura potencial del sistema estéril al ambiente (por ejemplo, gancho de flujo laminar), como para muestra, bolsa o intercambio de instrumentación al mínimo. En presentes incorporaciones del dispositivo, los colectores se diseñan redundantes para permitir el intercambio desde un componente estéril (por ejemplo, bolsa receptora del producto) al siguiente sin abertura. El intercambio adicional de la tubería, módulos o bolsas se realiza preferentemente utilizando soldadores de tubería estéril antes que conectores estériles.

Otras incorporaciones de los dispositivos inventivos podrían además comprender componentes como por ejemplo recipientes de acero inoxidable, alojamientos de filtro o tuberías que pueden ser esterilizadas in situ, solo o en combinación con los componentes descartables, siempre que la solidez y esterilización en el funcionamiento a largo plazo se aseguren.

Las incorporaciones adicionales del dispositivo inventivo B se diseñan para procesar el material desde fermentadores múltiples en plantas de fabricación mas grandes (B3). Un ejemplo se muestra en la representación esquemática en la Figura 6. Otras incorporaciones del dispositivo inventivo B se diseñan para

aumentar el factor de concentración total y el rendimiento de separación combinando los sistemas de adsorción/ desorción convectiva semicontinua (400) en series, con respecto a los recipientes de onda estériles en entre (200) (Véase Figura 6, B4).

Aún otras incorporaciones de dispositivos inventivos se diseñan para aumentar el factor de concentración total y el rendimiento de separación combinando un sistema de ultrafiltración continuo (300) en series con un sistema de adsorción/ desorción convectiva semicontinua (400) mediante un recipiente de onda adicional. Un ejemplo de una incorporación se muestra esquemáticamente en la Figura 7.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO PARA UTILIZAR EL DISPOSITIVO B

Las fermentaciones por perfusión continua se realizan sobre un período prolongado (una campaña), comúnmente entre 2 semanas y 6 meses o mas. El producto que contiene el fluido de cultivo de tejido (TCF), las células y los desechos celulares se procesa continuamente utilizando el dispositivo B. Una corriente de producto purificado parcialmente y concentrado (el "producto aislado") se produce y deja continuamente el dispositivo en su

salida (312). Utilizando la bomba (101) del sistema de extracción de partícula estéril, continua (100) la cosecha se bombea continuamente a través del montaje de filtración (103) en un promedio de flujo de cosecha por perfusión deseada Q_h de la fermentación.

La corriente de salida del sistema de filtración continua, es decir, el fluido de cultivo de tejido clarificado (cTCF) entra continuamente en el recipiente de onda (201).

Siempre que el recipiente de onda se rellena hasta un nivel predefinido, un peso o señal de nivel provoca automáticamente un ciclo de adsorción/ desorción del sistema de concentración / purificación semicontinuo estéril integrado. El material recolectado en el recipiente de onda se carga rápidamente en la estructura del adsorbedor, es decir, dentro de 4 horas, preferentemente dentro de 2 horas, y más preferentemente dentro de la hora o menos, así vaciando el recipiente de onda.

En las presentes incorporaciones mostradas en la Figura 3, la recolección del fluido de cultivo de tejido clarificado libre de partículas (cTCF) continúa todo el tiempo, en el pequeño recipiente de onda. El volumen en el pequeño recipiente de onda

además varía entre un valor máximo y un valor mínimo. En otra incorporación descrita en el texto anteriormente, la recolección se intercambia una y otra vez entre 2 recipientes de onda idénticos.

Mientras que cTCF continúa recolectando en el recipiente de onda, el adsorbedor cargado sufre mas paso de un protocolo cromatográfico predefinido, diseñado para adsorber el producto objetivo en forma purificada, concentrada y para preparar el adsorbedor para el siguiente ciclo de carga. Así, el ciclo total comprende carga, lavado, levigación, regeneración y reequilibrio, cada uno con uno o mas amortiguadores adecuados.

Dado que nuevamente los promedios de flujo durante estos pasos pueden ser altos debidos a su naturaleza de adsorbedores convectivos, el tiempo del ciclo total se mantiene bajo, es decir, debajo de 6 horas, preferentemente debajo de 3 horas y aun preferentemente debajo de 1,5 horas. Además, el sistema integrado es diseñado de manera tal que la estructura adsorbedora está lista para el siguiente ciclo de carga antes de que el recipiente de onda se llene nuevamente, así permitiendo el funcionamiento semicontinuo.

La siguiente Tabla 2 muestra un ejemplo de un método para utilizar una presente incorporación del dispositivo inventivo B para el aislamiento del Factor VIII recombinante de coagulación de sangre humana (datos mostrados a gran escala). El método probó ser únicamente beneficiosal. Los rendimientos de cada ciclo de adsorción / desorción fueron similares en serie, con todo el rendimiento del producto total aumentado por mas de 10% debido al menor tiempo de residencia del producto y así minimizó la degradación del producto. El mismo método probó además ser muy beneficiosal para el aislamiento de variantes de FVIII modificados por ingeniería genética, incluyendo FVIII de dominio B borrado, que es significativamente diferente del FVIII de longitud plena en tamaño y otras características. Se espera que sea eficaz para la producción de otras proteínas y biomoléculas también.

El protocolo cromatográfico en sí (químicas amortiguadoras & secuencia, volúmenes de carga y promedios de flujo) pueden desarrollarse en experimentos cromatográficos en serie para cada molécula individual y puede entonces ser transferido para utilizarse con incorporaciones del dispositivo inventivo.

Tabla 2

Ejemplo de método para utilizar una presente incorporación del dispositivo B para el aislamiento continuo de FVIII y variantes de FVIII desde una fermentación por perfusión continua

Parámetro	Objetivo
Promedio de flujo promedio de cosecha Qh de perfusión continua [l/d]	2000
Recipiente de onda: volumen de trabajo máximo Vs [l]	200
Volumen de carga [volumen de matrices]	600
Volumen de matriz de adsorbedor instalado en el dispositivo B [ml]	260
Promedio de flujo de carga [volúmenes de matriz/min]	12
Volumen de carga [l]	156
Tiempo de carga [l]	50
Tiempo cromatográfico total [h] (protocolo que comprende cargar, lavar, levigar y varios pasos de regeneración/ reequilibrio)	1,5
Tiempo de inactividad del adsorbedor/ciclo [h]	0,372
Ciclos/ periodo de 24 horas	12,8
Tiempo de recolección [h]	1,872

Tiempo de residencia de producto medio aprox. en dispositivo (tiempo de recolección + tiempo de carga + tiempo de levigación)	2,7
---	-----

Para cada molécula del producto individual, un criterio se define para la estructura de adsorbedor convectivo, por ejemplo, basado en la presión durante la carga, o recuperación. Comúnmente un número máximo de ciclos n_{max} se especifica y valida. Una vez que la estructura del adsorbedor ha sido utilizada en la operación semicontinua a través de ciclos n_{max} , se ha intercambiado contra otra estructura adsorbedora idéntica sin comprometer la integridad y esterilidad del sistema. En presentes incorporaciones esto se hace en analogía con la estructura de filtración estéril, continua utilizando colectores y conectores estériles, o utilizando tubería flexible descartable y soldadores de tubería estéril.

Cuando se utiliza la incorporación del dispositivo inventivo mostrado en la Figura 3, lateral derecho, una corriente estéril de amortiguador, solución de ajuste de pH, solución estabilizadora o agua para inyección se agrega ya sea continuamente o intermitentemente desde un recipiente estéril (204) utilizando una bomba de adición amortiguadora (203). Además, las condiciones de CTCF pueden además ajustarse

libremente, por ejemplo, en términos de fuerza iónica, pH, adición de estabilizadores, etc.

Beneficios de la Invención

Los dispositivos inventivos y los métodos respectivos para utilizar los dispositivos solucionan los problemas de procesos de aislamiento convencionales delineados anteriormente (véase antecedente general de la invención).

En todas las incorporaciones de los dispositivos A y B y métodos respectivos para utilizar los dispositivos, el tiempo de residencia del producto en un medio potencialmente perjudicial es únicamente minimizado, lo cual aumenta significativamente el rendimiento y la calidad de los productos biológicos complejos intrínsecamente inestables. La capacidad de planta puede aumentarse y los costos de los productos reducirse.

Además, los dispositivos y métodos respectivos eliminan la necesidad de tener grandes instalaciones de habitaciones frías o recipientes fríos para el almacenamiento intermedio de grandes volúmenes de cosecha, así reduciendo los costos de inversión de

planta y realizando completamente la ventaja de ser compacto y movable de la fermentación por perfusión.

Las incorporaciones de los dispositivos inventivos y los métodos respectivos reducen los costos de mano de obra en comparación con el procesamiento en serie convencional que requiere intensiva mano de obra debido al intrínsecamente alto grado de automatización. Los dispositivos nuevos permiten la operación continua, 24 horas por día, sobre períodos prolongados, maximizando la producción volumétrica y la utilización del equipo.

Además, los dispositivos inventivos eliminan las dificultades logísticas en plantas de uno o múltiples fermentadores. Las incorporaciones puede procesar material desde uno o más fermentaciones por perfusión continua.

Relevantemente, dado que los dispositivos y métodos nuevos permiten una operación completamente estéril, asuntos de carga microbial, así como también, asuntos de endotoxina se eliminan, lo cual podría no lograrse mediante procesamiento aséptico seguido por filtración estéril simple.

Además, los dispositivos inventivos permiten evitar o minimizar la necesidad de validación de limpieza debido a la utilización de elementos descartables. A través de las características únicas de los dispositivos y métodos inventivos, módulos descartables, así como también, tuberías, bolsas y montajes pueden ser utilizados durante un largo período (hasta toda la extensión de la campaña), así dramáticamente disminuyendo los costos y realizando la utilización de elementos descartables altamente atractivos desde un punto de vista económico.

Las presentes incorporaciones de los dispositivos inventivos A y B y los métodos respectivos han probado ser especialmente eficaces para la fabricación de Factor VIII recombinante de coagulación, así como también, versiones realizadas por ingeniería genética de FVIII incluyendo, pero sin limitar, FVIII de domino B borrado. Sin embargo, las invenciones pueden claramente esperarse que sean similarmente eficaces para la producción de otras proteínas y moléculas biológicas, en particular proteínas complejas intrínsecamente inestables, como por ejemplo Factor VII, Factor IX, Factor X, y otros.



Beneficios del Dispositivo A y Método Respectivo

La Figura 8 muestra un ejemplo del sorprendente aumento de capacidad de filtro que los solicitantes descubrieron para el elemento de extracción de partículas continuo integrado (100).

La Figura 10 muestra una distribución de tiempo de residencia típico y tiempo de residencia medio del producto en el sistema UF medio continuo (300) de una incorporación del paso inventivo A, según se determina mediante adsorción UV del retenido a 280nm, con una proteína modelo bajo condiciones típicas. Como puede verse, el tiempo de residencia medio del producto en el sistema es solamente aproximadamente 40 minutos. Además, el tiempo de residencia total del producto en esta presente incorporación del dispositivo A, desde la línea de cosecha del fermentador hasta el retenido final concentrado (aislado) se mantiene entre 1-2 horas o menos. Esto es entonces menos de 1/10 de tiempo de residencia de 28 horas o mas en un proceso de aislamiento en serie convencional, en el cual el producto (cosecha) se recoge durante al menos 24 horas (a varios

días), luego de lo cual el producto se procesa comúnmente durante al menos 4-10 horas.

La Figura 11 muestra una comparación de los rendimientos de aislamiento total resultante de factor de coagulación recombinante (rFVIII) desde la fermentación por perfusión continua libre de plasma- proteína para el proceso de aislamiento en serie convencional (filtración en serie mas UF en serie) y utilizando el dispositivo inventivo A y el método respectivo. Como puede verse desde la figura, el proceso continuo inventivo logra significativamente tener un rendimiento de producto mas elevado, el cual puede conducir a capacidades de fabricación aumentadas y costos de fabricación reducidos.

Durante el método inventivo de uso del dispositivo A, la presión transmembrana de la ultrafiltración continua integrada va a aumentar, con tiempo, mientras que el flujo de membrana específico (en litros/hora/m²/barra) disminuye en una producción volumétrica constante. Es común para todos los procesos de ultrafiltración y se debe a sus efectos como polarización de concentración, formación de capa de gel y contaminación. Sin embargo, en contraste con la ultrafiltración en serie, como puede verse en el ejemplo mostrado en la Figura 12, los cambios de

presión y el flujo específico son extremadamente bajos con el dispositivo A, permitiendo la operación continua durante semanas a la vez, antes de que las membranas necesiten ser limpiadas o reemplazadas. Adicionalmente, el promedio de cambio y rendimiento total del sistema es muy insensible al producto producido o la línea celular usada en la fermentación por perfusión continua (Figura 12). Además, el dispositivo inventivo A y el método respectivo se ubica idealmente como una plataforma genérica para la rápida producción de varias proteínas dado que actúa sólida y predeciblemente con varias proteínas objetivo desde diferentes líneas celulares.

Sorpresivamente, los solicitantes descubrieron que los efectos negativos de la formación de capa de gel y el contaminante están de hecho mucho mas minimizados con el dispositivo A, que un volumen total mucho mas grande por área de ultrafiltro instalada puede procesarse, antes que limpiar o reemplazar los filtros sea necesario. La Figura 13 muestra el rendimiento sólido del dispositivo inventivo A en un largo plazo. Luego de aproximadamente 25 días, la presión transmembrana sorpresivamente pareció estabilizarse en un estado casi firme, sugiriendo un rendimiento aun mayor a largo plazo. El día 27, el promedio de flujo de retención se dobló deliberadamente para

probar el efecto de una mayor producción. Luego de 34 días, se enjuagó rápidamente con 0,5 M de NaOH estéril. Luego de esto, TMP nuevamente se estabilizó, o al menos aumentó solamente en un promedio extremadamente bajo. Luego de 70 horas de operación estable continua, el promedio de flujo de reciclado se redujo deliberadamente a la mitad para probar el efecto sobre el rendimiento del sistema. Como se esperaba, TMP comenzó a aumentar con un promedio un poco mas alto debido a la transferencia de masa reducida y así aumentó la concentración de pared en la superficie de la membrana. Sin embargo, 95 días de operación se completaron exitosa y sólidamente antes de que el sistema se apague. Un total de cierre de 4500 litros ha sido procesado por m^2 de área de membrana, con una mano de obra manual mínima (solamente muestreo diario). En comparación, el proceso de ultrafiltración en serie convencional optimizado para la misma aplicación tiene 45 veces menos capacidad de carga, a aproximadamente 100 l/ m^2 y requiere de al menos 1-2 operadores tiempo completo.

También sorpresivamente, la selectividad del dispositivo inventivo A, en particular su sistema de ultrafiltración continua integrada (300), probó ser significativamente mayor luego la selectividad del proceso en serie convencional. Los expertos en

el tema saben que en la ultrafiltración en serie convencional, una membrana secundaria se forma desde macromoléculas retenidas durante la etapa inicial del proceso (capa de gel), que reduce la reducción del peso molecular aparente. El resultado es que tanto la molécula objetivo como las proteínas contaminantes pequeñas son retenidas, lo cual hace que la purificación simultanea sea imposible. Además, con ultrafiltración en serie convencional es posible separar proteínas que sean menores a un factor de 10 aparte en términos de su peso molecular. Sin embargo, como puede verse desde la Figura 14, con el proceso de ultrafiltración continuo integrado es posible ajustar condiciones para eficazmente separar IL-2SA (aproximadamente 16 kD) y proteína fluorescente verde GFP (27-30 kD). Este rendimiento de separación mas alta esperada permite la concentración y purificación simultanea.

Beneficios del Dispositivo B y Método respectivo

La Figura 15 ilustra el rendimiento del dispositivo inventivo B. Utilizando un adsorbedor convectivo comercial (Munstang Q, Pall Corporation, módulo de capa 15), cerca de 100 ciclos de adsorción / desorción convectiva han sido desarrollados, así concentrando y purificando variante FVIII

recombinante desde un cultivo por perfusión continua. El rendimiento promedio logrado fue de aproximadamente 95% (resultados obtenidos de la variación del ensayo) mientras que la presión permaneció relativamente constante sobre el número entero de ciclos realizados. Además, se puede especificar que al menos 100 ciclos consecutivos pueden realizarse antes de cambiar la estructura del adsorbedor.

Como se ha mostrado en la descripción detallada del método para utilizar el dispositivo inventivo B, el tiempo de residencia medio total del producto en una incorporación presente es menor a 3 horas, antes de que se levigue en forma concentrada, estabilizada y purificada en el amortiguador adecuado. Esto es significativamente menor entonces mas de 24 horas de tiempo de residencia en un proceso de separación en serie convencional realizado una vez al día y así resulta en rendimientos significativamente mayores de los productos proteicos intrínsecamente lábiles. En una presente incorporación descrita anteriormente, aproximadamente 13 ciclos se realizan por día, lo cual significa en contexto de la Figura 15 que el montaje del adsorbedor semicontinuo necesitaría intercambiarse solamente cada 7-8 días, lo cual se realiza sin comprometer la esterilidad y la continuidad del funcionamiento.

La Figura 16 muestra un ejemplo de UV y perfil de conductividad sobre un ciclo de regeneración y adsorción / desorción única típica con el dispositivo B. Puede notarse que mas de 450 volúmenes de adsorbedor (CVs) pueden cargarse, mientras que el producto se leviga en un pico muy agudo. Los contaminantes se extraen significativamente en el flujo durante la fase de carga, así como también, durante el lavado y la fase de regeneración.

La Figura 17 ilustra el desarrollo de purificación del proceso inventivo que comprende adsorción / desorción convectiva semicontinua. Un ejemplo de gel de variante FVIII aislado se muestra. Como puede verse, las fracciones de levigación, que incluyen 95% de la variante cargada FVIII (según se determina mediante el ensayo de actividad separada), contiene significativamente menos proteína que la carga y son así purificadas. No son visibles otras bandas de degradación adicional en el levigado (aislado), lo que indica excelente calidad del producto.

En resumen, el dispositivo inventivo B es capaz de lograr rendimiento de purificación similar en comparación con los

procesos en serie, mientras que al mismo tiempo minimizan pérdidas de rendimiento para productos proteicos intrínsecamente inestables, así como también, temas relacionados con la calidad del producto, debido a la minimización del tiempo de residencia del producto. Al mismo tiempo, los costos de trabajo se reducen dramáticamente debido al intrínsecamente alto grado de automatización del proceso inventivo, requiriendo de mínima intervención de operadores.

Aunque la presente invención ha sido descrita en detalle mediante ilustración y ejemplo con el fin de que se pueda comprender, será evidente para los expertos en la materia que ciertos cambios y modificaciones pueden realizarse. Además, la descripción y ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención que se ve delineada en las reivindicaciones adjuntas.

De tal manera, se entiende que las incorporaciones de la invención en la presente que proporcionan un método mejorado de filtración para generar un alto rendimiento de una molécula de interés desde una corriente de alimentación dada son meramente ilustrativas de la solicitud de los principios de la invención. Será evidente desde la presente invención que cambios de forma, métodos de uso, y aplicaciones de los elementos de lo revelado

pueden realizarse sin alejarse del espíritu de la invención, o del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Nuevos
Reivindicaciones

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para purificar una molécula de interés desde una mezcla de fluido clarificada heterogénea, caracterizado porque comprende:

filtrar una mezcla de fluido clarificada heterogénea mediante ultrafiltración continua en un promedio de flujo específico por debajo del punto de transición de la molécula de interés en la región dependiente de presión del flujo versus la curva de presión de transmembrana (TMP), en donde el promedio de flujo específico se mantiene sustancialmente constante a través de la ultrafiltración continua.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque además comprende filtrar la mezcla clarificada en un promedio de flujo específico que produce una concentración de pared menos de 20% por encima de la concentración de retención.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque además comprende filtrar la mezcla clarificada en un promedio de flujo específico que produce una concentración de pared menos de 15% por encima de la concentración de retención.

4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque además comprende filtrar la mezcla clarificada en un promedio de flujo específico que produce una concentración de pared menos de 10% por encima de la concentración de retención.

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque además comprende: filtrar la mezcla de fluido clarificado a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados igual a 0,1 a 2 veces el promedio de flujo volumétrico de la mezcla de fluido clarificado en litros / hora.

6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque la membrana de ultrafiltración tiene un área en metros cuadrados igual a 0,3 a 1 vez el promedio de flujo volumétrico de la mezcla de fluido clarificado en litros/ hora.

7. Un proceso para purificar una proteína de interés desde una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogéneo caracterizado porque comprende:

(a) producir mediante proceso de fermentación por perfusión continua una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea que contiene una proteína de interés;

(b) transferir la mezcla de fluido del cultivo de tejido a un proceso de extracción de partícula continuo integrado con el proceso de fermentación por perfusión continua;

(c) extraer los contaminantes de partículas desde el fluido de cultivo de tejido en el proceso de extracción de partícula continuo para producir un fluido de cultivo de tejido clarificado que contiene la proteína de interés;

(d) transferir el fluido de cultivo de tejido clarificado a un proceso de purificación continuo integrado con el proceso de extracción de partícula continuo; y

(e) purificar la proteína de interés desde el fluido de cultivo de tejido clarificado en el proceso de purificación continuo;

en donde el promedio de flujo específico de la mezcla a través del proceso de fermentación por perfusión continua, el proceso de extracción de partícula continuo y el proceso de purificación continua se mantiene sustancialmente constante.

8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7 caracterizado porque el proceso de purificación continua es ultrafiltración continua.

9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque además comprende filtrar la mezcla de cultivo de tejido clarificada en un promedio de flujo específico que produce una concentración de pared menor que una cantidad que está 20% por encima de la concentración de retención.

10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque además comprende filtrar la mezcla de cultivo de tejido clarificada en un promedio de flujo específico que produce una concentración de pared menor que una cantidad que está 15% por encima de la concentración de retención.

11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque además comprende filtrar la mezcla de cultivo de tejido clarificada en un promedio de flujo específico que produce una concentración de pared menor que una cantidad que está 10% por encima de la concentración de retención.

12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque además comprende: filtrar la mezcla de cultivo de tejido clarificada a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados igual a un rango de entre 0,1 a 2

veces el promedio de flujo volumétrico de la fermentación por perfusión continua en litros / hora.

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque además comprende: filtrar la mezcla de cultivo de tejido clarificada a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados igual a un rango de entre 0,3 a 1 vez el promedio de flujo volumétrico de la fermentación por perfusión continua en litros / hora.

14. Un proceso para purificar una proteína de interés desde una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogéneo caracterizado porque comprende:

(a) producir mediante proceso de fermentación por perfusión continua una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogénea que contiene una proteína de interés;

(b) transferir la mezcla de fluido del cultivo de tejido a un proceso de extracción de partícula continuo integrado con el proceso de fermentación por perfusión continua;

(c) extraer los contaminantes de partículas desde el fluido de cultivo de tejido en el proceso de extracción de partícula continuo para producir un fluido de cultivo de tejido clarificado que contiene la proteína de interés;

(d) transferir el fluido de cultivo de tejido clarificado a un recipiente de onda integrado con el proceso de extracción de partícula continuo; y

(e) transferir de manera intermitente el fluido de cultivo de tejido clarificado a un adsorbedor/desorbedor convectivo integrado con el recipiente de onda; y

(f) purificar la proteína de interés desde el fluido de cultivo de tejido clarificado en el adsorbedor/desorbedor convectivo para producir un producto aislado estéril, libre de partícula, concentrado y parcialmente purificado que contiene la proteína de interés;

en donde el promedio de flujo específico de la mezcla a través del proceso de fermentación por perfusión continua y el proceso de extracción de partículas continua se mantiene sustancialmente constante.

15. Un aparato para separar una proteína de interés de una mezcla de cultivo de tejido heterogénea, caracterizado porque comprende:

(a) un sistema de fermentación por perfusión continua;

(b) un sistema de extracción de partícula continuo integrado con el sistema de fermentación por perfusión; y

(c) un sistema de purificación continuo integrado con el sistema de extracción de partícula, caracterizado porque el aparato se mantiene bajo condiciones estériles.

16. El aparato de acuerdo con la reivindicación 15 caracterizado porque comprende:

(a) un sistema de fermentación por perfusión continua adaptado para producir continuamente un fluido de cultivo de tejido que contiene una proteína de interés en un promedio de flujo volumétrico sustancialmente constante;

(b) un sistema de extracción de partícula continuo integrado y adaptado para recibir continuamente el fluido de cultivo de tejido desde el sistema de fermentación por perfusión y producir continuamente un fluido de cultivo de tejido clarificado; y

(c) un sistema de purificación continua integrado con y adaptado para recibir continuamente el fluido de cultivo de tejido clarificado desde el sistema de extracción de partícula y producir continuamente un producto aislado que contiene la proteína de interés, en donde el aparato se mantiene bajo condiciones estériles.

17. El aparato de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado porque el sistema de purificación continua es un sistema de ultrafiltración que comprende una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados igual a 0,1 a 2 veces el promedio de flujo volumétrico de la fermentación por perfusión continua en litros / hora.

18. El aparato de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado porque el sistema de purificación continua es un sistema de ultrafiltración que comprende una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados igual a 0,3 a 1 vez el promedio de flujo volumétrico de la mezcla de fluido clarificado en litros / hora.

19. Un aparato para la separación de una proteína de interés desde una corriente de fluido de cultivo de tejido, caracterizado porque comprende:

- (a) un sistema de fermentación por perfusión continua;
- (b) un sistema de extracción de partículas continuo integrado con el sistema de fermentación por perfusión; y
- (c) un sistema de purificación intermitente integrado con el sistema de extracción de partículas; caracterizado porque el aparato se mantiene bajo condiciones estériles.

20. El aparato de acuerdo con la reivindicación 19 caracterizado porque comprende:

(a) un sistema de fermentación por perfusión adaptado para producir continuamente un fluido de cultivo de tejido que contiene una proteína de interés;

(b) un sistema de extracción de partícula integrado con y adaptado para recibir continuamente el fluido de cultivo de tejido desde un reactor y producir continuamente un fluido de cultivo de tejido clarificado;

(c) un recipiente de onda integrado con y adaptado para recibir continuamente el fluido de cultivo de tejido clarificado desde el sistema de extracción de partícula y liberar semicontinualmente el fluido de cultivo de tejido clarificado, y

(d) un sistema de purificación integrado con y adaptado para recibir semicontinualmente el fluido de cultivo de tejido clarificado desde el recipiente de onda; en donde el aparato está adaptado para mantenerse bajo condiciones estériles.

21. El aparato de la reivindicación 19, caracterizado porque el sistema de purificación comprende un sistema de adsorción/desorción convectiva.

22. El proceso de la reivindicación 8, caracterizado porque la presión de transmembrana en el proceso de ultrafiltración continua aumenta con el tiempo.

23. El proceso de la reivindicación 7, caracterizado porque los promedios de flujo de una corriente permeato (Q_p) y una corriente de salida aislada continua (Q_i) que salen del proceso de purificación continua se ajustan para coincidir sustancialmente con el promedio de flujo de de la corriente cosecha (Q_h) que sale de la fermentación por perfusión continua de manera tal que:

$$Q_p + Q_i = Q_h$$

donde Q_p se mantiene sustancialmente constante.

24. El proceso de la reivindicación 23, caracterizado porque los promedios de flujo Q_h y Q_i se ajustan y controlan de manera tal que se alcanza un factor de concentración deseada que satisface:

$$Q_i = 1/c_f * Q_h$$