



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-31230

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO **DISPOSITIVOS Y METODOS**

**PARA LA FABRICACION CONTINUA INTEGRADA
DE MOLECULAS BIOLOGICAS**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE **BAYER HEALTHCARE LLC**

DOMICILIO **Tarrytown, New York, EE.UU.**

74. APODERADO **Carlos Orlando Mayu R.**

22. BOGOTÁ, D. C., **28 Mayo 2007**

R.N. 30-04-2007

Proceso de registro de patentes

7/11/07
1

Ministerio de Industria y Comercio
Superintendencia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-031230- -00000-0000
Fee: 2007-03-28 15:32:45 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYH
Dre: 378 PASERACIONALI
Act 411 REPRESENTACION
Folios: 109

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1. SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I

☒ Capítulo II

2.

S LICITANTE
(71)

Nombre: Bayer Healthcare LLC

Dirección 555 White Plains Road, Tarrytown,
New York 10591, EE.UU.

Nacionalidad o Domicilio:

Tarrytown, New York 10591, EE.UU.

Lugar de Constitución:

Teléfono

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número: _____

3.

REPRESENTANTE
AP DERADO

Nombre: CARLOS ORLANDO MAYA
RODRIGUEZ

Dirección: Cr. 13 A No 28-38, Mz 2
Bufete 245. Parque Central Bavaria

Teléfono 3419841 Fax: 3368592

E-mail: pct@tmtamayo.net

IDENTIFICACION

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número: 17.117.818 TP: 17.402

4.

INVENTOR(ES)
(72)

Nombres: 1) Jens Holger Vogel
2) Roberto Giovannini
3) Konstantin B. Konstantinov
4) Huong My Nguyen
5) Paul Wu

Dirección: 1) 302 Commodore Drive, Richmond, California 94804, USA.
2) 655 Vernon Street, Oakland, California 94610, USA.
3) 116 Foxglove Ln, Walnut Creek, California 94597, USA.
4) 751 Naples Street, San Francisco, California 94112, USA.
5) 79 Bates Blvd., Orinda, California 94563, USA.

Nacionalidad o Domicilio: 1) Ciudadano de Alemania.
2) Ciudadano de Suiza.
3) Ciudadano de EE.UU.
4) Ciudadano de EE.UU.
5) Ciudadano de EE.UU.

5. PCT (86)

Solicitud internacional No. PCT/US2005/035364

Fecha: 30/09/2005

Publicación internacional No. WO 2006/039588 A2

Fecha: 13/04/2006

6. Título (54)

DISPOSITIVOS Y MÉTODOS PARA LA FABRICACIÓN CONTINUA INTEGRADA DE
MOLECULAS BIOLÓGICAS

7. Clasificación Internacional (51)

8. Prioridad

Si ☒ No ☐

(33) País de Origen

EE. UU.

(32) Fecha

30/09/2004

(31) Número de Solicitud

US 60/614.995

9.

Comprobante de pago No. 07-25,238

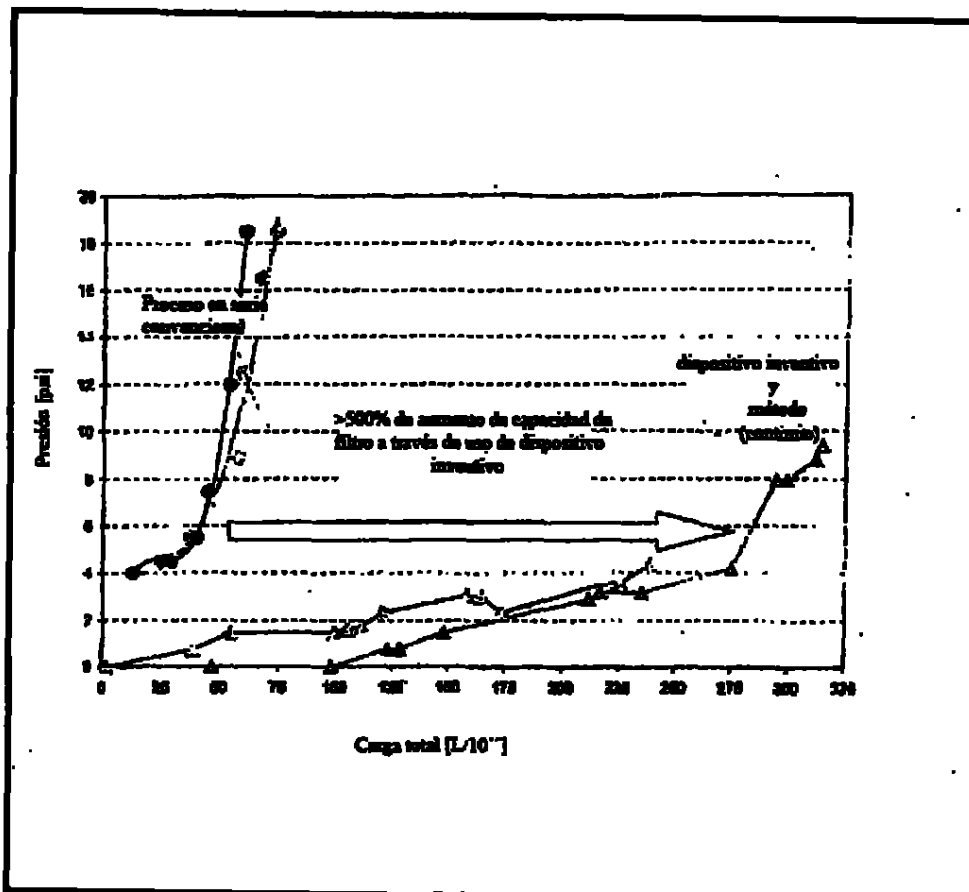
Fecha MARZO 28 DE 2007

10.

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros: FOTOCOPIA DE LA PUBLICACION INTERNACIONAL - SOLICITUD EXAMEN PRELIMINAR

11. FIGURA CARACTERISTICA



12. Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZFIRMA: [Firma manuscrita]

C.C 17.117.818 TP 17.402

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-031230-00000-0000
Fec: 2007-03-28 15:32:45 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEYII
Eve: 379 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folio: 198

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 25,238
FECHA : MARZO 28 DE 2007

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CARLOS TANAYO Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	48608188	28/03/2007	552,750.00
CARLOS TANAYO Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	48608195	28/03/2007	11,000.00

C O N C E P T O

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SOM: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS



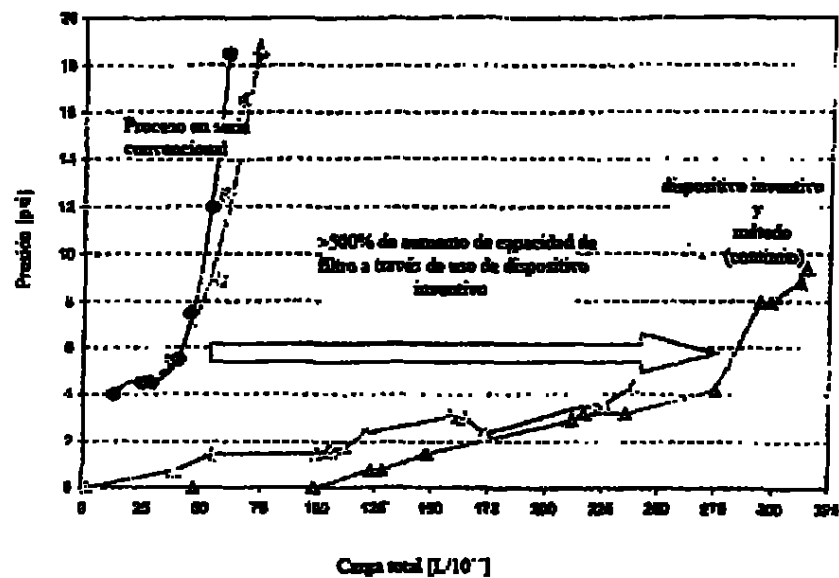
RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

4

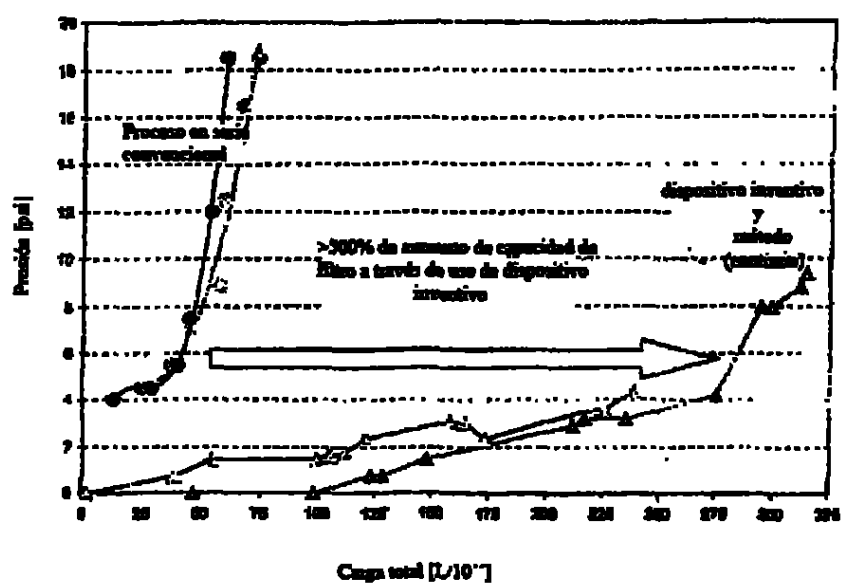
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: 28 de marzo de 2007 (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) Pais SI US 60/614,985 30/09/2004 EE.UU	(51) Int Cl: (71) Solicitante(s) Bayer Healthcare LLC (72) Inventor(es) 1.- Jens Holger Vogel 2.- Roberto Giovannini 3.- Konstantin B. Konstantinov 4.- Huong My Nguyen 5.- Paul Wu (74) Apoderado: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ
(85) Fecha limite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 30/09/2005 No. de solicitud PCT/US2005/035364	(87) Publicación internacional Fecha: 13/04/2006 N° publicación: WO 2006/039588 A2
(54) Título: DISPOSITIVOS Y MÉTODOS PARA LA FABRICACIÓN CONTINUA INTEGRADA DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS	

Reivindicación(es):



Un proceso para purificar una molécula de interés desde una mezcla de fluido clarificada heterogénea, que comprende:

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



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 April 2006 (13.04.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/039588 A2

- (51) International Patent Classification:
C87K 1/447 (2006.01) C12P 21/06 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2005/035364
- (22) International Filing Date:
30 September 2005 (30.09.2005)
- (25) Filing Language:
English
- (26) Publication Language:
English
- (30) Priority Data:
60/614,995 30 September 2004 (30.09.2004) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BAYER
HEALTHCARE LLC [US/US]; 511 Benedict Avenue,
Tarrytown, NY 10591 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventor/Applicants (for US only): VOGEL, Jens
[DE/DE]; 189 Shoreline Ct., Richmond, CA 94804 (US).
GIOVANNINI, Roberto [CH/CH]; 655 Vernon Street,
Oakland, CA 94610 (US). KONSTANTINOV, Kon-
stantin, B. [US/US]; 116 Foxglove Ln., Walnut Creek,
CA 94597 (US). NGUYEN, Huong [US/US]; 751 Maple
Street, San Francisco, CA 94112 (US). WU, Paul [—/US];
79 Bates Blvd., Orinda, CA 94563 (US).

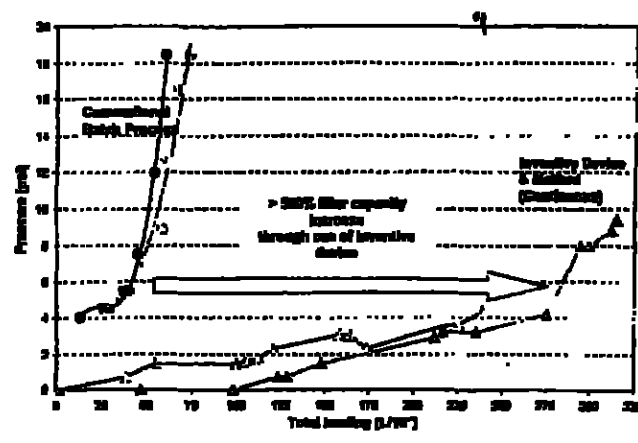
- (74) Agents: WIGHT, Christopher, L. et al.; Holland & Hart
LLP, 555 - 17th Street, Suite 3200, Denver, CO 80201 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AU, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, FI, FR, GB,
GR, GT, HK, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP,
KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TO).

Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: DEVICES AND METHODS FOR INTEGRATED CONTINUOUS MANUFACTURING OF BIOLOGICAL
MOLECULES

Example comparison of total load capacities per m² of filter capacity for conventional bench process and
evaluation of inventive device and system for continuous particle removal (integrated continuous filtration system
using modified commercial filter capacity. Example method producing maximum fluid completion Factor V21
shown.



(57) Abstract: The present invention relates to a process and apparatus for purifying a molecule of interest from a heterogeneous
clarified fluid mixture. The apparatus of the invention generally comprises a continuous perfusion fermentation system, a continuous
particle removal system integrated with the perfusion fermentation system; and a continuous purification system integrated with the
particle removal system, which is maintained under sterile conditions. The process comprises filtering a heterogeneous clarified
fluid mixture by continuous ultrafiltration at a specific flow rate below the transition point of the molecule of interest in the pressure-
dependent region of the flux versus TMP curve, wherein the specific flow rate is maintained substantially constant throughout the
continuous ultrafiltration.

WO 2006/039588 A2

DEVICES AND METHODS FOR INTEGRATED CONTINUOUS MANUFACTURING OF BIOLOGICAL MOLECULES

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to an improved method and system for purifying a molecule of interest from a heterogeneous mixture of molecules. More particularly, the present invention is directed to methods for purifying a protein of interest in a tissue culture fluid feedstream from a continuous perfusion fermentation process.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

It is well known to those familiar with the field that in recent years several continuous cell culture processes, also called continuous perfusion processes, have been established with great commercial success. However, the isolation process
15 following continuous perfusion fermentation is generally a batch process, and is physically and logistically separated from the continuous upstream process. In these processes, the main purpose of the isolation step is to capture the product out of high volumes of relatively dilute culture supernatant. Concentration of the product has to be emphasized with respect to process logistics and space requirements, while
20 simultaneous removal of contaminants (purification) is important to minimize the required number of further downstream purification steps.

Figure 1 shows a schematic of a typical state-of-the-art isolation process from continuous perfusion fermentation, as it is well known to those familiar with the field. The continuous perfusion fermentation system comprises a cell retention
25 device (1), which keeps most of the cells producing the product in the fermentation system. A continuous harvest stream from the continuous perfusion system, still containing some cells, debris and other particles is pumped using a harvest pump (2) into large collection vessels (3), such as stainless steel tanks. These harvest storage vessels usually have to be cooled in order to keep product losses due to
30 degradation within a feasible range.

Once a specified volume has been collected, which is typically after 1-4 days or more, the harvest collection vessels are disconnected from the sterile fermentation

vessel and the collected material is designated as one harvest batch. The next step is to remove cells, debris and particles (step 2). In industrial scale this is typically done using centrifugation (4) followed by dead-end membrane filtration (5), or by dead-end depth-filtration (6) followed by dead-end membrane filtration (7). Another technique sometimes used is tangential flow (or "crossflow") microfiltration. In any case, the product of the particle removal process is a batch of clarified tissue culture fluid, or cTCF (8). More details on particle separation for biotechnological products can be found in standard textbooks, such as *Biotechnology, Vol. 3, Bioprocessing*, Wiley-VCH, 2 edition (1996), ISBN: 3527283137.

10 In the next step (step 3), the batch of clarified tissue culture fluid is further processed to concentrate and, if possible, purify the product. This is typically done by crossflow ultrafiltration or by packed bed chromatography.

In the case of crossflow ultrafiltration, the cTCF is pumped into the recycle tank (9) of the system. A pump is used (10) to push the material through a crossflow ultrafilter. The product is retained by the membrane and recycled as retentate into the recycle tank, while water and smaller contaminants are pushed through the membranes into the permeate (11) due to the trans-membrane pressure generated by the pressure drop in the ultrafiltration module. In each passage through the filter, the cTCF therefore gets more concentrated, and the total cTCF volume is reduced until a desired concentration factor is reached. Once the desired concentration factor is reached, the process is stopped, and the remaining concentrate volume (isolate) is drained from the system and collected. More details on crossflow ultrafiltration for concentration of biotechnological products can be found in standard textbooks, such as *Biotechnology, Vol. 3, Bioprocessing*, Wiley-VCH, 2 edition (1996), ISBN: 3527283137.

In case of packed bed chromatography, the cTCF is pumped over a chromatography column (12) containing a packed resin bed. The product binds to the resin and is then eluted in usually concentrated and purified form (isolate, 13) using a suitable elution buffer (14), after which the column is cleaned and regenerated using adequate buffers and cleaning solutions (14).

Other chromatography variants that have been proposed for concentration/purification of cTCF are expanded bed chromatography and

9

membrane chromatography. Expanded bed chromatography can process particle containing solutions. However, filtration of the isolate after chromatography is still required, although filtration areas are reduced. Membrane chromatography utilizes stacks of modified microfiltration membranes instead of packed resin beds. The

5 advantage is that mass transfer is largely convective rather than diffusive, which allows faster separation. Otherwise, the process is typically equivalent to standard packed bed chromatography. More details on chromatography for concentration and purification of biotechnological products can be found in standard textbooks, such as Protein Purification, Principles, High-Resolution Methods, and Applications, Wiley-

10 VCH, 2. Edition (1998), ISBN 0-471-18626-0.

Often, the bulk isolate is then frozen and stored for later use in further downstream purification steps.

Thus, as described above, the isolation process is generally a batch process, and is physically and logistically separated from the continuous upstream process.

15 Also, while fermentation has to be performed sterile, isolation (i.e. particle removal and concentration/purification) is essentially performed clean, but not sterile.

The state-of-the-art processes as described above have a number of problems:

P1. Yield losses and potential quality reduction due to high product

20 residence time. The harvest from the continuous perfusion fermentation needs to be collected and stored over significant periods of time, as outlined above, before an isolation batch can be processed. Collected harvest, although chilled, still provides a detrimental milieu for complex and inherently unstable protein products. Therefore, significant product losses occur, which reduces plant capacity and increases cost of

25 goods. Furthermore, the product quality can be adversely affected.

P2. Large cold room facilities or cooled vessels are required for intermediate storage of large harvest volumes, leading to high capital costs and negating the cited compactness and mobility advantage of perfusion fermenters.

P3. Conventional concentration/purification technologies (e.g.,

30 ultrafiltration, packed bed chromatography) have relatively low volumetric

76
10

throughput, significant turnaround times and are relatively labor intensive. As a result, typically not more than 1 batch process is performed per day.

P4. Moreover, current isolation processes and methods have logistical difficulties dealing with the varying process volumes in fermentation plants involving more than one fermenter. In large-scale continuous perfusion plants, a varying number of fermenters are operational.

P5. Furthermore, state-of-the-art isolation processes are operated clean, but can not be operated sterile. This often leads to a significant number of rejected batches due to microbial load issues.

10 P6. Utilization of disposables, such as disposable filters, assemblies, bags, etc., although very desirable in the production of human parenterals (e.g., to avoid cleaning and cleaning validation and other issues) is very costly, and in fact often not economical.

15 Accordingly, it is an object of the present invention to provide an integrated, continuous protein separation process that is capable of operating for sustained periods of time under sterile conditions.

SUMMARY OF INVENTION

20 The present invention is directed to a novel apparatus and process for purifying molecules from a heterogeneous fluid mixture. More particularly, the invention is directed to a process for purifying a molecule of interest from a heterogeneous clarified fluid mixture from which particulate contaminants have been removed. The process comprises the step of filtering a heterogeneous clarified fluid mixture by continuous ultrafiltration at a specific flow rate below the transition point of the molecule of interest in the pressure-dependent region of the flux versus TMP curve, wherein the specific flow rate is maintained substantially constant throughout the continuous ultrafiltration.

30 In particular embodiments, the process of the invention comprises filtering the clarified fluid mixture through an ultrafiltration membrane having an area in square meters approximately equal to between 0.1 to 2 times the volumetric flow

rate of the clarified fluid mixture in liters/hour. In another embodiment, the process of the invention comprises filtering the clarified fluid mixture through an ultrafiltration membrane having an area in square meters approximately equal to between 0.3 to 1 times the volumetric flow rate of the clarified fluid mixture in
5 liters/hour.

The process of the invention advantageously permits filtering the clarified mixture at a specific flow rate that produces a wall concentration less than about 20%, less than 15% or less than 10% greater than the retentate concentration, without appreciable concentration polarization.

10 In a more specific embodiment, the invention is directed to an integrated, continuous and sterile process for continuous perfusion fermentation, particulate removal and purification/ concentration. In one aspect of the invention, the process comprises filtering the tissue culture mixture by a separation process that selectively separates the protein of interest from the mixture at an operational set point below
15 the transition point of the protein in the pressure-dependent region of the flux versus TMP curve to produce a sterile, particle-free, concentrated and partially purified product isolate, where the specific flow rate through the separation process is maintained substantially constant at a level less than the transition point of the protein.

20 In another aspect of the invention, the process is a continuous process for purifying a protein of interest from a heterogeneous tissue culture fluid mixture, comprising:

- (a) producing by a continuous perfusion fermentation process a heterogeneous tissue culture fluid mixture containing a protein of interest;
- 25 (b) transferring the tissue culture fluid mixture to a continuous particle removal process integrated with the continuous perfusion fermentation process;
- (c) removing particulate contaminants from the tissue culture fluid in the continuous particle removal process to produce a clarified tissue culture fluid containing the protein of interest;
- 30 (d) transferring the clarified tissue culture fluid to a continuous purification process integrated with the continuous particle removal process; and

(e) purifying the protein of interest from the clarified tissue culture fluid in the continuous purification process;

wherein the specific flow rate of the mixture through the continuous perfusion fermentation process, continuous particle removal process and continuous purification process is maintained substantially constant.

In yet another aspect of the invention, the process is a semi-continuous process for purifying a protein of interest from a heterogeneous tissue culture fluid mixture, comprising:

- (a) producing by a continuous perfusion fermentation process a heterogeneous tissue culture fluid mixture containing a protein of interest;
- (b) transferring the tissue culture fluid mixture to a continuous particle removal process integrated with the continuous perfusion fermentation system;
- (c) removing particulate contaminants from the tissue culture fluid in the continuous particle removal process to produce a clarified tissue culture fluid containing the protein of interest;
- (d) transferring the clarified tissue culture fluid to a surge vessel integrated with the continuous particle removal process;
- (e) intermittently transferring the clarified tissue culture fluid to a purification process integrated with the surge vessel; and
- (e) purifying the protein of interest from the clarified tissue culture fluid in the purification system to produce a sterile, particle-free, concentrated and partially purified product isolate containing the protein of interest;

wherein the specific flow rate of the mixture through the continuous perfusion fermentation process and continuous particle removal process is maintained substantially constant.

The present invention is also directed to an apparatus for separating a protein of interest from a heterogeneous tissue culture fluid mixture. In one aspect of the invention, the apparatus comprises: (a) a continuous perfusion fermentation system; (b) a continuous particle removal system integrated with the perfusion fermentation system; and (c) a continuous purification system integrated with the particle removal system, wherein the apparatus is adapted to maintain sterile conditions.

In another aspect of the invention, the apparatus comprises: (a) a continuous perfusion fermentation system; (b) a continuous particle removal system integrated with the perfusion fermentation system; and (c) an intermittent purification system integrated with the particle removal system, wherein the apparatus is adapted to maintain sterile conditions.

The purification system may, for example, be an ultrafiltration system or a convective adsorption/desorption system, or any other system capable of purifying or partially purifying a protein of interest from a heterogeneous mixture in an integrated, continuous or semi-continuous, sterile system as described herein.

The process and apparatus of the invention are adapted to permit continuous processing of a heterogeneous fluid mixture, such as a cell culture fluid, at a substantially constant flow rate. In a particular aspect of the invention, the process and apparatus of the invention are adapted to permit continuous processing of a heterogeneous cell or tissue culture fluid mixture at a substantially constant flow rate below the transition point of the protein in the pressure-dependent region of the flux versus TMP curve for a continuous period and throughout the purification process.

These and other aspects of the invention are described in detail below in the following detailed description of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The accompanying drawings, which are incorporated in and constitute a part of the specification, illustrate embodiments of the invention, and, together with the detailed description of the embodiment, serve to explain the principles of the invention and its benefits.

FIG. 1: Schematic of conventional continuous perfusion process followed by 3 physically and logistically segregated isolation process steps (batch harvest collection, batch particle removal and batch concentration/purification)

FIG. 2: Schematic representation of 2 embodiments of inventive device A for continuous, integrated and sterile manufacturing. Schematic of embodiment A1 shown on left hand side and schematic of embodiment A2 shown on right hand side.

FIG. 3: Schematic representation of 2 embodiments of inventive device B for continuous, integrated and sterile manufacturing. Schematic of embodiment B1 shown on left hand side and schematic of embodiment B2 shown on right hand side.

FIG. 4: Schematic of an embodiment of inventive integrated, continuous particle removal system (100), an element of both inventive device A and inventive device B.

FIG. 5: Schematic representations of additional embodiments of inventive device A which combine multiple elements to either increase overall plant capacity (A3) or concentration and separation performance (A4).

FIG. 6: Schematic representations of additional embodiments of inventive device B.

FIG. 7: Additional embodiment of inventive devices that combines the elements of device A and device B in series to increase overall concentration and separation performance.

FIG. 8: Example comparison of total load capacities per 10" of filter capsule for conventional batch process and embodiment of inventive device and method for continuous particle removal (integrated continuous filtration process) using identical commercial filter capsules. Example method producing recombinant blood coagulation Factor VIII shown.

Concentration factor of both protein products, as determined by specific assays, and volumetric concentration factor shown as a function of continuous process time.

FIG. 15: Example for performance of inventive device B. Yield and pressure drop over close to 100 consecutive adsorption/desorption cycles with convective adsorber (target protein: genetically engineered blood coagulation Factor FVIII variant; convective adsorber: commercial adsorber, Mustang Q, Pall Corporation).

FIG. 16: Example for performance of inventive device B. UV and conductivity profile during a typical adsorption/desorption cycle with convective adsorber (target protein: genetically engineered blood coagulation Factor FVIII variant; convective adsorber: commercial adsorber, Mustang Q, Pall Corporation).

FIG. 17: Example for performance of inventive device B. SDS-Page gel (silver stained) of Load = clarified harvest continuously leaving the particle removal system (100) and semi-continuously loaded onto the convective adsorber system (400) and typical adsorption/desorption eluate shown. Target protein: genetically engineered blood coagulation Factor FVIII variant; convective adsorber: commercial adsorber, Mustang Q, Pall Corporation). Eluate was diluted back to load concentration before run on gel.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

Except as expressly defined herein, the terminology used in this application is standard within the art. The following definitions of certain terms are provided herein to assure clarity and definiteness to the meaning of the claims.

Units, prefixes, and symbols may be denoted in their SI accepted form. Numeric ranges recited herein are inclusive of the numbers defining the range and include and are supportive of each integer within the defined range. Unless otherwise noted, the terms "a" or "an" are to be construed as meaning "at least one of." The section headings used herein are for organizational purposes only and are not to be construed as limiting the subject matter described. All documents, or

portions of documents, cited in this application, including but not limited to patents, patent applications, articles, books, and treatises, are hereby expressly incorporated by reference in their entirety for any purpose.

5 The term "clarification" and "clarified" mean the removal of particulate matter from a solution so that the remaining solution passes through a 0.2 μ m membrane.

10 The term "continuous perfusion fermentation" refers to a steady state fermentation system or process that operates without interruption and in which cells or micro-organisms are maintained in culture in the exponential growth phase by the continuous addition of fresh medium that is balanced by the removal of cell suspension from the bioreactor.

 The terms "cultivating," "culturing," "growing," "maintaining," "supporting," and "expanding" are synonymous in meaning that cells remain viable and capable of producing progeny.

15 The term "concentration," in its verb form, means the removal of water from a solution such that the amount of a molecule of interest per volume of remaining solution increases.

20 The term "concentration polarization" means the accumulation of retained molecules (gel layer) on the surface of the membrane caused by a combination of factors: transmembrane pressure, crossflow velocity, sample viscosity, and solute concentration.

25 The term "continuous," means uninterrupted in time, sequence and/or operation for prolonged periods of time. As used in reference to the fermentation, clarification and filtration processes of the present invention, "continuous" means that the processes are physically and logistically integrated so as to permit operation without interruption for a prolonged period of time sufficient to produce a sterile, particle-free, concentrated and partially purified product isolate containing the protein of interest. The term continuous, as used in reference to the processes of the invention, is also understood to mean that a process is not performed in a batch-wise
30 manner or in a truly continuous manner. The processes of the present invention are capable of continuous operation, for example, for prolonged periods ranging from 1

day to several months without interrupting the operation or sequence of the processes. As used in the present invention, the processes are operated for a continuous period greater than 2, 3, 4, 5, 6, or 7 days, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8 weeks, or 3, 4, 5, 6 or more months.

5 The terms "semi-continuous" and "intermittent" mean that one or more processes or elements of an integrated system operate in a discontinuous or batch-wise manner, while other processes or elements of the integrated system operate in a continuous manner. For example, in some embodiments of the invention, the purification process is a convective adsorption/desorption process, which typically
10 requires adsorption of the heterogeneous mixture of an adsorption substrate, eventually resulting in saturation of the substrate, and which requires termination of the adsorption process and desorption or release of the bound fraction. Such a process is inherently intermittent, though capable of being integrated with upstream processes that are continuous.

15 The term "convective adsorption/desorption" means a chromatographic process in which mass transfer occurs primarily by convection. Convective adsorption/desorption is a process in which a fraction of a mixture containing a molecule of interest is separated from another fraction of the mixture, by means of adsorption of one fraction to a substrate followed by desorption of that fraction from
20 the substrate.

 The term "crossflow" or "fluid crossflow" means the flow of the fluid across the top of the membrane surface.

 The term "integrated," as used in reference to multiple systems and/or processes, means that the systems and/or processes are physically and logistically
25 connected so as to constitute a unified system capable of operating continuously. In the context of the system of the present invention, which is directed to an integrated continuous or semi-continuous system for producing a particle-free, concentrated and partially purified protein of interest, an integrated system will connect different components directly and in a manner sufficient to maintain sterile conditions
30 between the different components of the system.

¶

The terms "media" (plural) and "medium" (singular) are synonymous and are used interchangeably herein, and use of one form of the term does not imply exclusion of the other form.

5 The term "mixture" means a heterogeneous combination of molecules and compounds containing a molecule of interest, such as a protein, and various contaminants. A preferred mixture of the current invention is a tissue culture fluid comprised of a heterogeneous mixture of proteins including an exogenous protein of interest, which is obtained initially from a continuous perfusion fermentation process.

10 The term "gel layer" means the microscopically thin layer of molecules that can form on the top of a membrane. It can affect retention of molecules by clogging the membrane surface and thereby reduce the filtrate flow, or, in constant flow operation, increase TMP.

15 The term "molecule of interest" means particles or other species of molecule that is to be separated from a solution or suspension in a fluid (e.g., a liquid). The particles or molecules of interest are separated from the fluid and, in most instances, from other particles or molecules in the fluid. The size of the molecule of interest to be separated will determine the pore size of the membrane to be utilized. Preferably, the molecules of interest are of biological or biochemical
20 origin or produced by transgenic or in vitro processes and include proteins, peptides, polypeptides, antibodies or antibody fragments. Examples of preferred feedstream origins include mammalian cell culture and microorganism cell culture such as bacteria, fungi, and yeast. It should also be noted that species to be filtered out
25 include non-desirable polypeptides, proteins, cellular components, DNA, colloids, mycoplasma, endotoxins, viruses, carbohydrates, and other molecules of biological interest, whether glycosylated or not.

 The term "permeate" is used synonymously with filtrate.

 The term "product isolate" means a particle-free, concentrated and partially purified product containing a protein of interest. A product isolate is a product that
30 has achieved a degree of purification and concentration comparable to that achieved by an ultrafiltration or convective adsorption/desorption process. A product isolate

is not necessarily homogeneous, but will be substantially purified relative to the initial bulk product produced by the fermentation process.

The term "specific flow rate" is used interchangeably with the term "filtrate flux" as it relates to the filtrate. The specific retentate flow rate is the flow rate of
5 the retentate normalized on the membrane area used.

As used in reference to flux, the term "substantially constant" means that the flux is maintained at a generally constant level during a substantial period during the course of the filtration.

The term "tissue culture fluid" means a heterogeneous mixture of
10 components derived from a tissue culture medium. In preferred aspects of the invention, the tissue culture fluid is derived from a continuous perfusion fermentation process. A "clarified" tissue culture fluid is a tissue culture fluid that has been prefiltered to remove cell debris and other large macromolecules.

The term "transmembrane pressure" and its acronym "TMP" mean the
15 average applied pressure from the feed to the filtrate side of the membrane. TMP is calculated by $TMP [bar] = [(PF + PR) / 2] - Pf$ where PF is the feed pressure, PR is the retentate pressure, and Pf is the filtrate pressure.

The term "recovery" means the amount of a molecule of interest that can be retrieved after processing. Usually expressed as a percentage of starting material or
20 yield.

The term "retentate" means the portion of the sample that does not pass through the membrane, also known as the concentrate.

The term "ultrafiltration" means a form of filtration that uses microporous or semipermeable membranes to preferentially separate fluids or ions on the basis of
25 differential size or molecular weight. Ultrafiltration is typically used to filter out molecules having a molecular weight larger than about 10,000 daltons.

The present invention is directed to an integrated, continuous and sterile process comprising continuous perfusion fermentation, particulate removal and
30 purification/ concentration. In one aspect of the invention, the process comprises

filtering the tissue culture mixture by a separation process that selectively separates the protein of interest from the mixture at an operational set point below the transition point of the protein in the pressure-dependent region of the flux versus TMP curve to produce a sterile, particle-free, concentrated and partially purified product isolate, where the specific flow rate through the separation process is maintained substantially constant at a level less than the transition point of the protein.

In another aspect of the invention, the process is a continuous process comprising: (a) continuously producing by continuous perfusion fermentation a heterogeneous tissue culture fluid mixture containing a protein of interest; (b) continuously transferring the tissue culture fluid mixture to a particle removal process integrated with the continuous perfusion fermentation system; (c) continuously removing particulate contaminants from the tissue culture fluid in the particle removal process to continuously produce a clarified tissue culture fluid containing the protein of interest; (d) continuously transferring the clarified tissue culture fluid to a purification process integrated with the particle removal system; and (e) continuously separating the protein of interest from the clarified tissue culture fluid in the purification system to continuously produce a sterile, particle-free, concentrated and partially purified product isolate containing the protein of interest.

In yet another aspect of the invention, the process is a semi-continuous process comprising: (a) continuously producing by continuous perfusion fermentation a heterogeneous tissue culture fluid mixture containing a protein of interest; (b) continuously transferring the tissue culture fluid mixture to a particle removal process integrated with the continuous perfusion fermentation system; (c) continuously removing particulate contaminants from the tissue culture fluid in the particle removal process to continuously produce a clarified tissue culture fluid containing the protein of interest; (d) continuously transferring the clarified tissue culture fluid to a surge vessel integrated with the particle removal process; (e) intermittently transferring the clarified tissue culture fluid to a purification process integrated with the surge vessel; and (e) separating the protein of interest from the clarified tissue culture fluid in the purification system to produce a sterile, particle-

free, concentrated and partially purified product isolate containing the protein of interest, wherein the specific flow rate of the mixture through the continuous perfusion fermentation process and continuous particle removal process is maintained substantially constant, and on average equals the time-averaged throughput of the integrated semi-continuous purification process.

Devices for Practicing Methods of Invention

The present invention is also directed to an apparatus for separating a protein of interest from a heterogeneous tissue culture fluid mixture. Generally, the apparatus comprises: (a) a continuous perfusion fermentation system; (b) a continuous particle removal system integrated with the perfusion fermentation system; and (c) a continuous purification system integrated with the particle removal system, wherein the apparatus is adapted to maintain sterile conditions. In another aspect of the invention, the apparatus comprises: (a) a continuous perfusion fermentation system; (b) a continuous particle removal system integrated with the perfusion fermentation system; and (c) an intermittent purification system integrated with the particle removal system, wherein the apparatus is adapted to maintain sterile conditions. The purification system may, for example, be an ultrafiltration system or a convective adsorption/desorption system, or any other system capable of purifying or partially purifying a protein of interest from a heterogeneous mixture in an integrated, continuous or semi-continuous, sterile system as described herein.

The process and apparatus of the invention are adapted to permit continuous processing of a heterogeneous tissue culture fluid mixture at a substantially constant flow rate. In a particular aspect of the invention, the process and apparatus of the invention are adapted to permit continuous processing of a heterogeneous tissue culture fluid mixture at a substantially constant flow rate below the transition point of the protein in the pressure-dependent region of the flux versus TMP curve for a continuous period and throughout the purification process.

In specific embodiments, the invention provides two novel devices (A, B) which are each composed of 3 distinct but fully integrated elements, all of which have an essential role and together form a uniquely efficient, continuous protein isolation system platform that solves the problems with the prior art described above.

The three distinct elements of each device are firstly an integrated, continuous particle removal system (100), secondly a sterile surge vessel (200) and thirdly an integrated concentration/purification system (300,400, respectively). All three elements and thereby the developed novel devices and methods of using these devices are described in detail below.

To provide for integrated continuous or semi-continuous concentration/purification of the protein product, the inventive device A (of which two embodiments are shown in Figure 2) comprises an integrated continuous, sterile ultrafiltration system (300), while inventive device B (of which 2 embodiments are shown in Figure 3) comprises an integrated, semi-continuous convective adsorption/desorption system (400).

The devices of the invention are directly integrated with one or more continuous perfusion fermenter(s) and thus form a novel continuous, integrated manufacturing platform.

15 DEVICE A

Integrated Continuous Particle Removal System (100)

Figure 2 shows 2 embodiments of inventive device A. The integrated continuous particle removal system (100) is directly connected to the harvest side of the continuous perfusion fermentation system (1).

20 Figure 4 shows a more detailed schematic representation of an embodiment of the inventive integrated continuous particle removal system (100), which consists of a pump (101), a pressure gauge or transmitter, respectively (107), a connection manifold (102) and an assembly of several filter trains (103). All components are connected with flexible tubing and/or hard piping.

25 The pump (101) is a conventional peristaltic pump, which allows gentle pumping of the cell culture harvest without any rotating parts or seals contacting the sterile product. The pump and the pump tubing is sized to deliver the desired harvest flow rate of the cell culture fermentation system, which is up to 15 bioreactor volumes per day, e.g. up to 9.4 liters/hour for a 15 liter fermenter and up to 125
30 liters/hour for a 200 liter fermenter.

The pressure gauge or pressure transmitter (107) is designed such that it can be sterilized by autoclaving or irradiation. In the current design, either a re-usable piezoresistive transmitter in a stainless steel housing or a re-usable stainless steel pressure gauge are used. However, future improvements can include the use of disposable transmitters which can easily be sterilized by irradiation.

In a present embodiment the Connection manifold (102) consists of flexible tubing, with tubing clamps (or valves) and appropriate sterile connectors for allowing connection of additional filter train assemblies without compromising system sterility. Preferably, the tubing diameters are sized to yield linear fluid velocities of about 2 m/s or less at the desired flow rates, thereby avoiding high backpressures and shear. In another present embodiment, instead of the sterile connectors special flexible tubing pieces are used that can be welded with commercial tubing welders without compromising sterility. Such tubing pieces are made of PVC or other suitable polymers.

The filter train assembly (103) consist of at least two, preferably multiple identical filter trains (as shown in schematic), with only one of the filter trains open at any given time, as shown as an example in the Figure 4 (105).

Each filter train consists of at least one filter, preferably one pre-filter and one final filter in series (as shown in Figure 4). If required to increase capacity for a specific application, each filter train (105, 106 etc.) itself can also consist of multiple filters or filter trains in parallel (not shown).

In an embodiment of the invention shown in Figure 4, the second filter train of the assembly (106) is closed off by a pressure-sensitive rupture disc, or rupture pin, respectively (104). In operation, the function of the rupture disc, or rupture pin, is to automatically open up the flow-path to the second filter train (107) once the pressure in the first filter train (105) reaches a specified limit, thereby ensuring uninterrupted continuation of the filtration process. Commercially available rupture discs or rupture pins are utilized in the inventive system, which are otherwise used to provide safety pressure relief. In a present embodiment, rupture discs or rupture pins with a specified rupture pressure limit of not more than 16 PSI are used, which has proven to be very useful. However, a range of specified pressure limit is possible.

Each further filter train of the filter train assembly is also separated by a manual or automatic valve and another rupture disc or rupture pin. Once the second filter train (106) is operational, the valve to the next rupture disc or rupture pin, respectively, is opened, so that the next filter train can act as a backup and so forth.

5 In an alternative embodiment, automatically actuated valves are used exclusively, and in operation, a control system actuates the valves based on the input of a piezoresistive pressure sensor (107) which can also be sterilized by autoclaving. However, applicants discovered that the present design comprising the rupture disc or rupture pin, respectively, provides outstanding robustness in long-term operation.

10 The final filter rating is at least 3 μm or smaller, preferably 0.45 μm and still preferably 0.2 μm . The operating filter train (6) therefore retains all remaining cells, as well as, relevant cell debris and other particles, resulting in a particle-free output stream (9), the clarified tissue culture fluid (cTCF).

Different commercially available filter materials can be used. In the current design, disposable filter capsules are used, such as Sartopure or Sartoclear pre-filter capsules (Sartorius, Goettingen) and Sartobran final filter capsules (Sartorius, Goettingen), which can be sterilized by autoclaving or irradiation.

As an example of a present embodiment of the inventive device, designed for a flow rate of 1 liter/min, each filter train (105, 106 etc.) of the assembly (103) consists of 3 30" pre-filter capsules (Kleenpak Ultiplex, Pall Corp., 4.5 μm rated, 0.75 m^2 each) followed by 3 20" final filter capsules (Sartobran P, Sartorius, 0.45 $\mu\text{m}/0.2\mu\text{m}$ rated, 1.3 m^2 each). This particular embodiment has been found particularly useful for large-scale manufacturing of recombinant blood coagulation Factor VIII, as well as, genetically engineered FVIII variants including B-domain deleted FVIII.

However, applicants have discovered that when using inventive device and method, the efficiency of particle removal with a variety of available filter materials and configurations from different manufacturers (Pall, Sartorius, Cuno) is consistently and significantly improved compared to the respective conventional batch processes.

Therefore, the novel inventive device and process will also be beneficial for use with novel filter types and geometries, e.g. with filter types that increase available filter area per capsule, as well as, with filter types that provide a cross-flow pattern or other means to minimize cake built-up, such as vibration or filter element rotation.

In another embodiment of the inventive process, the filter train assembly (103) comprises only one sterile back up filter train closed by a rupture disc or rupture pin, respectively, but still multiple filter trains for operation. The first filter train of the assembly is operated until a specified pre-determined loading volume has been processed, after which operation is switched over (manually or automatic) to the next filter train in the assembly. The specific loading volume is specified so that under normal operating conditions the pressure limit of the rupture disc or rupture pin is not exceeded. If however the pressure increases more than usual during filtration, e.g. due to an unusually low filterability of the harvest, the back-up filter train ensures again uninterrupted continuous filtration by opening up once the specified pressure is exceeded. Following an opening of the back-up filter train, filtration is switched to another filter train of the assembly and another back-up filtration train with rupture disk or rupture pin is installed without compromising the sterility of the system.

It is well known to those knowledgeable in the field, that to keep both filter costs and processing times for batch particle removal processes at a minimum, batch filter trains need to be sized to have the lowest possible filter area required for providing the desired absolute flow rate (in liters/hour) and maximum pressure. The desired absolute flow rate in turn has to be high enough to provide feasible processing times for the desired batch volume. This inherently necessitates a high specific flow rate (in liters/hour/m² of filter area).

In contrast to a comparable optimized batch filtration system, the inventive device is designed for several fold lower specific flow rate, which is kept constant (in liters/hour/m² of installed filter area) so that the absolute flow rate is equal to the harvest flow rate of the continuous perfusion fermentation.

Applicants unexpectedly discovered that at such low specific flow rates the volume that can be processed through a filter is disproportionately higher than at the flow rates adjusted in batch processes.

It is important to note that in conventional batch isolation processes, such
5 low specific flow rates would not be feasible due to either extreme filtration areas (and thus costs), or too low of an absolute flow rate. This is primarily because most of the time, the batch particle removal equipment sits idle while harvest is being collected for the next batch. Moreover, the surprising disproportionate increase in achievable filter capacity of the inventive method allows for a significant reduction
10 in filter consumption and thus manufacturing costs.

Surge Vessel (200)

The outlet of the integrated continuous particle removal system is directly and constantly connected to a surge vessel (201), as shown in Figure 2. This surge vessel is a sterile vessel, such as, a disposable bag or a stainless steel vessel with at
15 least one inlet port and one outlet port, the latter preferably on the bottom of the vessel. A broad range of vessel sizes and designs can be utilized. However, the surge vessel is preferably sized to be small compared to the volumetric throughput of the system to keep the residence time of the product in the vessel at a minimum, i.e. below 24 hours, preferably below 8 hours, and still preferably below 4 hours.

20 Applicants discovered that such low product residence times, uniquely possible due to the inventive devices, allow significant increase in yield for inherently unstable protein products, thereby solving one of the problems of the prior art.

In some embodiments of the inventive devices, the surge vessel is located on
25 a balance or load cell (202), as shown for device B1 and B2 in Figure 3. This balance or load cell provides a weight signal to a computerized control system (not shown).

In addition, in an embodiment of the inventive devices (B2), a buffer vessel (204) is connected via a peristaltic pump (203) to the surge vessel. In operation, this
30 set-up is used to adjust the properties of the particle-free harvest stream, such as conductivity (ionic strength) or pH, by adding suitable buffer or diluent. In this case,

an optional mixing system (205) and sensors to monitor the desired condition (206), such as pH or conductivity, are used. In the present design, a magnetically coupled stirrer is used; however, other mixing systems, such as shakers or pulsating devices could be used as well.

5 Integrated continuous concentration/purification (300)

Device A, 2 embodiments of which are shown in Figure 2, comprises an integrated continuous, sterile ultrafiltration system (300). Embodiments of the continuous, sterile ultrafiltration system comprise a recycle pump (301) and recycle loop (306), one or more sterile crossflow ultrafiltration modules (303), a permeate
10 pump (305), a sterile permeate receiving vessel (307) on a balance or load cell (309) and a retentate pump (311). Furthermore, it comprises instrumentation in form of an inlet pressure gauge or transmitter (302), permeate pressure gauge or transmitter (304), outlet pressure gauge or transmitter (308), as well as, a recycle flow meter (310). In operation, the system outlet (312) provides a continuous stream of
15 concentrated and partially purified protein product, which can be continuously collected, frozen or further processed.

Inventive embodiment A2 comprises in addition a buffer or diluent vessel (314), a peristaltic buffer/diluent addition pump (313), as well as, flow-through sensors to monitor conditioning of the concentrate in the recycle loop, such as
20 sensors for pH and conductivity (315, 316). In operation, this set-up is used to adjust the properties of the particle-free harvest stream, such as conductivity (ionic strength) or pH, by adding suitable buffer or diluent. This set-up can also be used to add protein stabilizers. Although in inventive embodiment A2 the recycle loop itself acts as a mixing chamber, conditioning can alternatively also be performed by using
25 a surge vessel set-up as shown for device B (embodiment B2), comprising components (203, 204, 205, 206) as discussed later in this disclosure (see description of device B).

Embodiments of the inventive device also comprise a data-logging and programmable control system, which records incoming data signals from the
30 instrumentation (such as, but not limited to, pressures, flow rate, vessel weight, pH, conductivity) and controls the pump speeds according to a pre-defined control algorithm.

All pumps (301, 305, 311, 313) are peristaltic pumps, which allow pumping of the respective fluid streams without any rotating parts or seals contacting the sterile product stream. Applicants discovered that this is preferable to provide robust sterile long-term operation. However, other sterile pump designs can in principal be used. The recycle pump (301) and its pump tubing is sized to allow robust adjustment of the desired cross-flow rates of between 80 and 800 liters/hour per m² of installed membrane area, depending on the mass transfer characteristics of the ultrafiltration module used. The permeate pump is sized to allow robust and precise adjustment of a specific permeate flux of between 90% and 99% of the harvest flow rate from the continuous perfusion fermentation. The retentate pump is sized to allow a robust and precise adjustment of the retentate flow of between 1% and 10% of the harvest flow rate from the continuous perfusion fermentation.

Encapsulated ultrafiltration modules (303) are used to allow robust sterile operation, and are sterilized by autoclaving or irradiation. The optimal nominal molecular weight cut-off is chosen based on the molecular weight of the protein product of interest and has to be confirmed by standard experiments known to those in the art. A variety of membrane materials, such as polyethersulfone, hydrophilized polyethersulfone or regenerated cellulose can be used, as long as the entire membrane module can be sterilized by irradiation and/or autoclaving without damaging the membrane. It is expected that hydrophilic materials can increase efficiency due to their lower fouling tendencies.

Applicants discovered, that device A is uniquely efficient if the installed total ultrafiltration membrane area in square meters is equal to a range of between 0.1 to 2 times the volumetric flow rate of the harvest from the continuous perfusion fermentation in liters/hour. E.g. for a perfusion harvest flow rate of 1 liter/hour, the installed total membrane area should be between 0.1 and 2 square meters. Applicants discovered that the device A is yet more efficient, if the installed ultrafiltration membrane area in square meters is equal to a range of between 0.3 to 1 times the volumetric flow rate of the harvest from the continuous perfusion fermentation in liters/hour.

In one embodiment of the invention, commercially available "disposable" hollow fiber membrane modules (GE Healthcare, former Amersham Biosciences)

are used. However, a variety of encapsulated membranes and module designs can be used, such as spiral wound modules, encapsulated cassettes or capsules with enhanced mass transfer due to secondary flow patterns (e.g. vortex flow), rotating elements (e.g. dynamic disk filters) or vibrating filters. It is expected that especially
5 encapsulated ultrafiltration cassettes can be used beneficially in the inventive devices since they provide high mass transfer coefficients at relatively low required cross-flow rate, thereby reducing pump capacity, while keeping system complexity and investment costs low.

The inventive device allows not only continuous, but also truly sterile
10 operation, in contrast to just aseptic operation. Applicants achieved this by designing all product-contacting system components to withstand not only cleaning, but also sterilization by autoclaving, steaming in place or gamma-irradiation. In present embodiments disposable encapsulated modules are used for continuous particle removal (100), as well as, continuous ultrafiltration (300). Peristaltic pumps
15 are used to avoid any product contact with rotating elements and mechanical seals. Moreover, in present embodiments disposable tubing and bag assemblies are used instead of hard piping. Disposable product contacting components (e.g. tubing, bags, modules) or component groups are pre-assembled and sterilized together, thereby simplifying start-up and operation. The systems are designed to keep any
20 potential opening of the sterile system to the environment (e.g. laminar flow hood), as for sampling, bag or instrumentation exchange to a minimum. In present embodiments of the device, manifolds are designed redundant to allow switching from one sterile component (e.g. product receiving bag) to the next without opening. Additional exchange of tubing, modules or bags is preferably performed by using
25 sterile tubing welders rather than sterile connectors.

Other future embodiments of inventive devices could also comprise components such as stainless steel vessels, filter housings or piping that can be sterilized in place, alone or in combination with disposable components, as long as robustness and sterility in long-term operation is assured.

30 Additional embodiments of inventive device A are designed to process material from multiple fermenters in larger manufacturing plants (A3). An example is shown schematically in Figure 5. Further embodiments are designed to increase

the overall concentration factor and separation performance by combining 2 stages of continuous ultrafiltration systems (300) in series (A4, shown schematically in Figure 5).

5 DESCRIPTION OF METHOD OF USING DEVICE A

The continuous perfusion fermentations are operated over a long period of time (one campaign), typically between 2 weeks and 6 months or more. The tissue culture fluid (TCF) containing product, cells and cell-debris is continuously processed using the device A. A sterile, particle-free, concentrated and partially
10 purified product stream (the "product isolate") is produced and continuously leaves the device at its outlet (312). By using the pump (101) of the continuous, sterile particle removal system (100) the harvest is pumped continuously through the filtration assembly (103) at the desired perfusion harvest flow rate Q_h of the fermentation.

15 The output stream of the continuous filtration system, i.e. the clarified tissue culture fluid (cTCF), continuously enters the surge vessel (201). From the surge vessel the cTCF is continuously processed by a continuous, sterile ultrafiltration system (300) at a flow rate equal to the flow rate coming from the continuous perfusion fermentation. Due to the small sizing of the surge vessel relative to the
20 adjusted flow rates, the mean residence time of the product in the vessel is kept at a minimum, i.e. below 12 hours, preferably below 4 hours and still preferably below 2 hours.

Adequate crossflow and thus mass transfer is adjusted in the ultrafiltration module via the recycle pump (301). The retentate flow rate is adjusted and
25 controlled by using the retentate pump (311), thus yielding a constant and continuous flow rate Q_i of the concentrated product isolate leaving device A at its outlet (312). The permeate pump (305) is used to adjust and control the flow rate Q_p of the permeate, which is drawn continuously from the permeate side of the ultrafiltration module(s), and which consists of water and solutions components
30 small enough to pass through the ultrafiltration membrane (e.g. salts, small proteins).

The flow rates of permeate (Q_p) and retentate/isolate (Q_i) are carefully adjusted and controlled to match the harvest flow rate Q_h of the fermentation so that:

$$Q_p + Q_i = Q_h$$

- 5 At the same time, the flow rates are adjusted and controlled so that a desired concentration factor cf is achieved by satisfying:

$$Q_i = 1/cf * Q_h$$

- For example, to achieve a desired product concentration factor of 10fold in the isolate over the initial harvest concentration, Q_i is controlled at $Q_i = 1/10 * Q_h$ using
10 the retentate/isolate pump (311), while Q_p is controlled at $Q_p = 0.9 * Q_h$ using the permeate pump (305).

Since outflow rates are controlled by the pumps (305) and (311), the ultrafiltration system automatically draws a flow of $Q_p + Q_i$ from the small surge vessel (201).

- 15 In case of using embodiment A2 (see Figure 2 right hand side), a sterile stream of buffer or water for injection from vessel 314 is added to the continuous ultrafiltration system continuously at a constant flow rate Q_b using the buffer addition pump (313). Therefore, the conditions of the isolate can be freely and continuously adjusted, e.g. in terms of ionic strength, pH, addition of stabilizers, etc.
20 Flow rates are therefore controlled at

$$Q_p + Q_i = Q_h + Q_b$$

Furthermore, flow rate ratios can be chosen so that a desired concentration factor cf is achieved by satisfying $Q_i = 1/cf * (Q_h + Q_b)$. Alternatively, this process can be used to only alter conditions (e.g. pH, conductivity), by setting $Q_i = Q_h + Q_b$.

- 25 The novel method of using device A also contrasts with the UF batch processes (prior art) in terms of the operational set-point of the ultrafiltration itself. Conventional Batch UF processes are designed for a certain throughput through a low membrane area in a short period of time. Batch UF is thus generally operated at the transition point of pressure dependent to mass transfer controlled region (see
30 Figure 9). This leads to a desirably high initial specific flux, which however drops

significantly and rapidly over the course of seconds to minutes, as concentration polarization leads quickly to osmotic back-pressure and the formation of a limiting gel layer (secondary membrane). Such a high wall concentration of macromolecules also leads to an increased adsorption of compounds to the inner and outer membrane surface, i.e. to membrane fouling. This fouling would further reduce the permeate flux over time.

Applicants surprisingly discovered that with device A, many times higher overall loading capacities per area of installed ultrafiltration membrane are achieved by operating at the low end of the pressure-flux curve (see Figure 9):

The normalized wall concentration c_{wall} of a fully retained component can be described as follows:

$$c_{wall} = e^{\frac{J}{k_d}} \cdot c_{bulk}$$

with

J = specific permeate flux in liters/hour/m²

k_d = mass transfer coefficient in liters/hour/m²

c_{bulk} = concentration of the component in the solution bulk

Like in batch UF, the continuous UF is operated at optimized mass transfer coefficient to minimize concentration polarization. However, in contrast to batch ultrafiltration, applicants adjust the permeate flux J to be at the low end of the pressure-flux curve (see Figure 9). As a result of the exponential relationship, the wall concentration c_{wall} at the surface of the membrane is therefore significantly lower than it would be in batch ultrafiltration. For example, the present embodiment of the inventive method adjusts a target specific permeate flux of approximately 1/10 of the achievable mass transfer coefficient, thereby adjusting a wall concentration of only 10% above the adjusted bulk (or retentate) concentration.

The following Table 1 shows an example of a method for using device A (embodiment A1) for continuous isolation of a protein product from a development scale fermenter:

Table 1

Example of method for using a present embodiment of device A for continuous isolation of a protein product from continuous perfusion fermentation

Operational Parameter	Target
Harvest flow rate Q_h from continuous perfusion (controlled with pump 101)	5 liters/hour (120 liters/day)
Permeate flow rate Q_P (controlled with pump 305)	4.75 liters/hour
Retentate (product isolate) flow rate Q_i (controlled with pump 311)	0.25 liters/hour
Specific permeate flux J	2 liters/hour/m ²
Concentration factor cf	20 fold

- 5 For each individual product molecule, a lifetime criteria can be defined for the sterile continuous ultrafiltration set-up, e.g. based on trans-membrane pressure. Once the trans-membrane pressure limit is exceeded, the continuous sterile ultrafiltration set-up is exchanged against another identical set-up without compromising integrity and sterility of the system. This can be done in analogy to
- 10 the continuous, sterile filtration set-up by using either manifolds and sterile connectors, or by using disposable flexible tubing and sterile tubing welders.

DEVICE B

Integrated Continuous Particle Removal System (100)

- 15 Figure 3 shows 2 embodiments of inventive device B. The integrated continuous particle removal system (100) is directly connected to the harvest side of the continuous perfusion fermentation system (1). This part of device B is identical to device A (see detailed description of device A and Figure 4, above).

Surge Vessel (200)

- 20 The outlet of the integrated continuous particle removal system is directly and constantly connected to a surge vessel (201), as shown in Figure 3. This surge

34

vessel is a sterile vessel, such as, a disposable bag or a stainless steel vessel with at least one inlet port and one outlet port, the later preferably on the bottom of the vessel. A broad range of vessel sizes and designs can be utilized. However, the surge vessel is preferably sized to be small compared to the volumetric throughput of the system to keep the residence time of the product in the vessel low, i.e. below 26
5 hours, preferably below 12 hours and still preferably below 4 hours.

In device B, the surge vessel is located on a balance or load cell (202), as shown for embodiments B1 and B2 in Figure 3. This balance or load cell provides a weight signal to a computerized control system (not shown).

10 In addition, in an embodiment of the inventive device (B2), a buffer vessel (204) is connected via a peristaltic pump (203) to the surge vessel. In operation, this set-up is used to adjust the properties of the particle-free harvest stream, such as conductivity (ionic strength) or pH, by adding components for modifying the properties of the clarified tissue cultured received from the particle removal system,
15 such as a suitable buffer or diluent, or a suitable protein stabilizer. In this case, a present embodiment also comprises a mixing system (205) and sensors to monitor the desired condition (206), such as pH or conductivity, are used. In this present embodiment, a magnetically coupled stirrer is used; however, other mixing systems, such as shakers or pulsating devices could be used as well.

20 In another embodiment of the inventive device, 2 surge vessels are used. At any given time, one surge vessel is directly connected to the continuous particle removal system (100), thereby receiving clarified fluid, while the other one is connected to the semi-continuous concentration/purification system (400), thereby feeding a convective adsorption/desorption cycle. Switching between both is
25 realized through a control system, using the weight of the receiving vessel to trigger a switch once its maximum filling volume is reached.

Integrated semi-continuous concentration/purification (400)

Device B, 2 embodiments of which are shown in Figure 3, comprises an integrated semi-continuous, convective adsorption/desorption system (400).

30 The integrated semi-continuous convective adsorption/desorption system is designed and sized so that its loading flow rate (Q_{load}) is significantly higher than

the flow rate of the continuous perfusion harvesting and continuous filtration process (Q_h), i.e. $Q_{load} \gg Q_h$.

Embodiments of the integrated semi-continuous concentration/purification system (400) comprise a load pump (401), a multi-port valve assembly (402) and several buffer vessels (404), a 3-way-valve (403) connected to a sterile waste receiving vessel (413) and one or more convective adsorber module(s) (406), inlet- and outlet-pressure gauges or transmitters (405, 408), further instrumentation such as UV sensor (409), pH and conductivity sensors (409, 410), flow meter (412), as well as, another 3-way valve (407) connected also to the waste vessel (413) and the product eluate outlet (414).

Embodiments of the inventive device also comprise a data-logging and programmable control system (not shown), which records incoming data signals from the instrumentation (such as, but not limited to) pressures, UV, pH, conductivity, flow rate, surge vessel weight) and controls the automated valves and pump according to programmed protocols.

The load pump (401) is preferably a peristaltic pump to avoid direct contact of product or sterile buffers with any seals or mechanical parts. Applicants discovered that this is preferable to provide robust sterile long-term operation. However, other sterile pump designs can in principal be used. The load pump is sized depending on the installed matrix volume of the convective adsorber (406) to allow robust adjustment of at least 12 matrix volumes/minute. E.g., in one present embodiment, Mustang membrane adsorber capsules (Pall Corp.) are used that have a matrix volume of approx. 0.3 liters. Therefore, the load pump is sized to allow loading flow rates of up to 3.6 liters/minute.

The function of the multi-port valve assembly (402) is to allow switching between the product containing load drawn from the surge vessel (201) and each of the sterile buffers and cleaning solutions from the sterile buffer vessels (404). Present embodiments of device B utilize a series of automatically actuated pinch valves, which pinch the flexible tubing connected to each buffer vessel from the outside to close of and open each line. Applicants discovered that these pinch valves provide a particularly beneficial solution for device B since they avoid any product contact and thus do not need to be cleaned or sterilized. However, a wide range of

commercial valves suitable for sterile processing and known to those familiar with the field can be used, such as actuated membrane valves.

In the present embodiment, the 3-way valves (403, 407) are autoclavable actuated membrane valves. However, a variety of commercial valves suitable for sterile processing can in principal be used, including e.g. pinch valves.

The convective adsorber module (406) contains a chromatographic matrix with pre-dominantly convective mass transfer of the product to the adsorptive surface and, in contrast to conventional chromatography, is sterilized prior to operation by autoclaving, steaming or irradiation. The predominantly convective mass transfer allows, in contrast to conventional packed bed chromatography, very low adsorption/elution/regeneration cycle times, which applicants utilize in inventive device to realize semi-continuous operation.

In the present embodiment of the inventive device, the convective adsorber (406) consists of one or more commercially available membrane adsorber capsule(s) with ion exchange chemistry (Mustang, Pall corporation or Sartobind, Sartorius). However, the device can utilize other membrane adsorber materials and geometries and novel convective matrices such as monolithic matrices as well, since in contrast to conventional chromatography resin packing is eliminated and matrices can generally be encapsulated in ready-to-use modules.

Moreover, other chemistries, including convective affinity matrices comprising specific product-binding ligands will also yield uniquely beneficial performance in the inventive device.

In one embodiment of the inventive device, multiple convective adsorber modules are used in the device in form of an assembly of convective adsorber-trains in parallel, similar to the continuous particle removal system (100). The entire assembly with all adsorber-trains is sterilized together, allowing in operation switching from one adsorber-train to a fresh one should the first one reach the end of its useful life, as determined e.g. by a pre-defined criteria such as back-pressure during loading or maximum number of performed operating cycles. Each adsorber-train consists of either one individual module or multiple convective adsorber

modules in parallel and/or in series to increase binding capacity and/or improve capacity utilization.

It is important to emphasize that the inventive device allows not only continuous, but also truly sterile operation in contrast to just aseptic operation.

- 5 Applicants achieved this by designing all product-contacting system components to withstand not only cleaning, but also sterilization by autoclaving, steaming in place or gamma-irradiation. In present embodiments disposable encapsulated modules are used for continuous particle removal (100), as well as, semi-continuous sterile convective adsorption/desorption (400). Peristaltic pumps are used to avoid any
- 10 product contact with rotating elements and mechanical seals. Moreover, in present embodiments disposable tubing and bag assemblies are used instead of hard piping. Disposable product contacting components (e.g. tubing, bags, modules) or component groups are pre-assembled and sterilized together, thereby simplifying start-up and operation. The systems are designed to keep any potential opening of
- 15 the sterile system to the environment (e.g. laminar flow hood), as for sampling, bag or instrumentation exchange to a minimum. In present embodiments of the device, manifolds are designed redundant to allow switching from one sterile component (e.g. product receiving bag) to the next without opening. Additional exchange of tubing, modules or bags is preferably performed by using sterile tubing welders
- 20 rather than sterile connectors.

Other future embodiments of inventive devices could also comprise components such as stainless steel vessels, filter housings or piping that can be sterilized in place, alone or in combination with disposable components, as long as robustness and sterility in long-term operation is assured.

- 25 Additional embodiments of inventive device B are designed to process material from multiple fermenters in larger manufacturing plants (B3). An example is shown schematically in Figure 6. Further embodiments of inventive device B are designed to increase the overall concentration factor and separation performance by combining multiple convective adsorption/desorption systems (400) in series, with
- 30 respective sterile surge vessels in between (200) (see Figure 6, B4).

Yet further embodiments of inventive devices are designed to increase the overall concentration factor and separation performance by combining a continuous

ultrafiltration system (300) in series with a semi-continuous convective adsorption/desorption system (400) via an additional surge vessel. An example of an embodiment is shown schematically in Figure 7.

5 DESCRIPTION OF METHOD OF USING DEVICE B

The continuous perfusion fermentations are operated over a long period of time (one campaign), typically between 2 weeks and 6 months or more. The tissue culture fluid (TCF) containing product, cells and cell-debris is continuously processed using the device B. A sterile, particle-free, concentrated and partially
10 purified product stream (the "product isolate") is produced and continuously leaves the device at its outlet (414). By using the pump (101) of the continuous, sterile particle removal system (100) the harvest is pumped continuously through the filtration assembly (103) at the desired perfusion harvest flow rate Q_h of the fermentation.

15 The output stream of the continuous filtration system, i.e. the clarified tissue culture fluid (cTCF), continuously enters the surge vessel (201).

Whenever the surge vessel is filled to a pre-defined level, a weight or level signal triggers automatically an adsorption/desorption cycle of the integrated, sterile semi-continuous concentration/purification system. The material collected in the
20 surge vessel is loaded rapidly onto the adsorber set-up, i.e. within 4 hours, preferably within 2 hours, and still preferably within 1 hour or less, thus emptying the surge vessel.

In the present embodiments shown in Figure 3, collection of the particle-free clarified tissue culture fluid (cTCF) continues at all times, in the same small surge
25 vessel. The volume in the small surge vessel therefore varies between a minimum and maximum value. In another embodiment described in the text before, collection is switched back- and forth between 2 identical surge vessels.

While cTCF is continuing to collect in the surge vessel, the loaded adsorber undergoes more steps of a pre-defined chromatographic protocol, designed to desorb
30 the target product in concentrated, purified form and to ready the adsorber for the

next loading cycle. Thus, the overall cycle comprises loading, wash, elution, regeneration and reequilibration, each with one or more suitable buffers.

Since again flow rates during these steps can be high due to the nature of convective adsorbers, total cycle time is kept low, i.e. below 6 hours, preferably
5 below 3 hours and still preferably below 1.5 hours. Therefore, the integrated system is designed so that the adsorber set-up is ready for the next loading cycle before the surge vessel is filled again, thus allowing semi-continuous operation.

The following Table 2 shows an example of a method of using a present embodiment of the inventive device B for isolation of recombinant human blood-coagulation Factor VIII (large scale data shown). The method proved uniquely
10 beneficial. Yields and performance of each adsorption/desorption cycle was similar to batch, with the overall product yield increased by more than 10% due to the lower residence time of the product and thus minimized product degradation. The same method has also proven to be very beneficial for the isolation of genetically
15 engineered FVIII variants, including B-domain deleted FVIII, which is significantly different from full-length FVIII in size and other characteristics. It is expected to be useful for production of other proteins and biomolecules as well.

The chromatographic protocol itself (buffer chemistries & sequence, loading volumes and flow rates) can be developed in batch chromatography experiments for
20 each individual molecule and can then be readily transferred to be used with embodiments of the inventive device.

Table 2

Example of method for using a present embodiment of device B for continuous isolation of FVIII and FVIII variants from continuous perfusion fermentation

Parameter	Target
Harvest rate flow rate Qh of continuous perfusion [l/d]	2000
Surge vessel: max working volume Vs [l]	200
Loading volume [Matrix volumes]	600
Adsorber matrix volume installed in device B [ml]	260
Loading flow rate [Matrix volumes/min]	12
Loading volume [l]	156
Load time [min]	50
Total chromatographic time [h](protocol comprising load, wash, elution and several regeneration/re-equilibration steps)	1.5
Idle time of adsorber/cycle [h]	0.372
Cycles/24 hour period	12.8
Collection time [h]	1.872
Approx. mean product residence time in device (collection time + load time + elution time)	2.7

- 5 For each individual product molecule, a lifetime criteria is defined for the convective adsorber set-up, e.g. based on pressure during loading, or recovery. Typically, a maximum number of cycles n_{max} is specified and validated. Once the adsorber set-up has been used in semi-continuous operation through n_{max} cycles, it is exchanged against another identical adsorber set-up without compromising
- 10 integrity and sterility of the system. In present embodiments this is done in analogy to the continuous, sterile filtration set-up by using either manifolds and sterile connectors, or by using disposable flexible tubing and sterile tubing welders.

When using the embodiment of the inventive device shown in Figure 3, right hand side, a sterile stream of buffer, pH adjustment solution, stabilizer solution or water for injection is added either continuously or intermittently from a sterile vessel (204) using a buffer addition pump (203). Therefore, the conditions of the cTCF can be freely adjusted, e.g. in terms of ionic strength, pH, addition of stabilizers etc.

Benefits of Invention

The inventive devices and respective methods of using the devices solve the problems of conventional isolation processes outlined before (see general background of the invention).

10 In all embodiments of devices A and B and respective methods of using the devices, product residence time in potentially detrimental milieu is uniquely minimized, which significantly increases yield and quality of inherently unstable complex biological products. Plant capacity can be increased and cost of goods reduced.

15 Moreover, the devices and respective methods eliminate the need for large cold room facilities or cooled vessels for intermediate storage of large harvest volumes, thereby reducing plant investment costs and fully realizing the compactness and mobility advantage of perfusion fermentation.

Embodiments of both inventive devices and respective methods reduce labor costs compared to conventional, labor-intensive batch processing due to the inherently high degree of automation. The novel devices allow continuous operation, 24 hours a day, over long periods of time, maximizing volumetric throughput and equipment utilization.

Furthermore, inventive devices eliminate logistical difficulties in plants of one or multiple fermenters. Embodiments can process material from either one or multiple continuous perfusion fermentations.

Importantly, since the novel devices and methods allow completely sterile operation, microbial load issues, as well as, endotoxin issues are eliminated, which could not be achieved by aseptic processing followed by simple sterile filtration.

In addition, inventive devices enable avoiding or minimizing the need for cleaning validation due to the utilization of disposables. Through the unique characteristics of the inventive devices and methods, disposable modules, as well as, tubing, bags and assemblies can be used each for a long period of time (up to the entire length of the campaign), thereby dramatically lowering costs and making the utilization of disposables highly attractive from an economic standpoint.

Present embodiments of inventive devices A and B and respective methods have proven to be especially useful for manufacturing of recombinant blood coagulation Factor VIII, as well as, genetically engineered versions of FVIII including, but not limited to, B-domain deleted FVIII. However, the inventions can clearly be expected to be similarly useful for the production of other proteins and biological molecules, in particular complex inherently unstable proteins such as Factor VII, Factor IX, Factor X, and others.

Benefits of Device A and Respective Method

Figure 8 shows an example of the surprising filter capacity increase applicants discovered for the integrated continuous particle removal element (100).

Figure 10 shows a typical residence time distribution and mean residence time of the product in the continuous UF system (300) of an embodiment of inventive device A, as determined by UV adsorption of the retentate at 280nm, with a model protein under typical conditions. As can be seen, the mean residence time of the product in the system is only approximately 40 minutes. Therefore, the total residence time of the product in this present embodiment of device A, from fermenter harvest line to the final, concentrated retentate (isolate) is kept within 1-2 hours or less. This is less than 1/10 of the residence time of 28 hours or more in a conventional batch isolation process, in which the product (harvest) is collected for at least 24 hours (to several days), after which the product is processed for typically at least 4-10 hours.

Figure 11 shows a comparison of the resulting total isolation yields of recombinant blood coagulation factor (rFVIII) from plasma-protein free continuous perfusion fermentation for both a conventional batch isolation process (batch filtration plus batch UF) and using the inventive device A and respective method. As

can be seen from the figure, the inventive continuous process achieves significantly higher product yield, which can lead to increased manufacturing capacities and reduced manufacturing costs.

During the inventive method of using device A, the transmembrane pressure
5 of the integrated continuous ultrafiltration is going to increase with time, while the specific membrane flux (in liters/hour/m²/bar) is decreasing at constant volumetric throughput. This is common to all ultrafiltration processes and is due to effects like concentration polarization, gel-layer formation and fouling. However, in contrast to batch ultrafiltration, as can be seen from the example shown in Figure 12, the
10 changes of pressure and specific flux are extremely slow with device A, allowing continuous operation for weeks at a time, before the membranes need to be cleaned or replaced. Additionally, the rate of change and overall performance of the system is quite insensitive to the product produced or the cell-line used in the continuous perfusion fermentation (Figure 12). Therefore, the inventive device A and respective
15 method is also ideally suited as a generic platform for rapid production of various proteins since it performs robustly and predictably with various target proteins from different cell-lines.

Surprisingly, applicants discovered that the negative effects of gel-layer formation and fouling are in fact so much minimized with device A, that a much
20 larger total volume per installed ultrafilter area can be processed, before cleaning or replacement of filters becomes necessary. Figure 13 shows the robust performance of the inventive device A in a long-term run. After approximately 25 days, the transmembrane pressure surprisingly appeared to stabilize in a quasi-steady-state, suggesting even higher long-term performance. On day 27, the retentate flow rate
25 was purposefully doubled to test the effect of higher throughput. After 34 days, a short flush was performed with sterile 0.5 M NaOH, without opening the system, and thus while maintaining full system integrity and sterility. After this, the TMP again stabilized, or at least increased only at an extremely low rate. After 70 days of continuous, sterile operation, the recycle flow rate was purposefully reduced in half
30 to test the effect on system performance. As expected, the TMP started to increase with a somewhat higher rate due to the reduced mass transfer and thus increased wall concentration at the membrane surface. However, 95 days of operation were

44

successfully and robustly completed before the system was turned off. A total of close to 4500 liters have been processed per m² of membrane area, with minimal manual labor (daily sampling only). In comparison, the optimized conventional batch ultrafiltration process for the same application has 45-fold less loading capacity, at approx. 100 l/m², and requires at least 1-2 operators full time.

Also surprisingly, the selectivity of the inventive device A, in particular its integrated continuous ultrafiltration system (300), proved to be significantly higher than the selectivity of a conventional batch process. It is well known to those familiar with the field that in conventional batch ultrafiltration, a secondary membrane is formed from retained macromolecules during the initial stage of the process (gel layer), which reduces the apparent molecular weight cut-off. The result is that both the target molecule and contaminating smaller proteins are retained, which makes significant simultaneous purification practically impossible. Therefore, with conventional batch ultrafiltration it is seldom possible to separate proteins that are less than a factor of 10 apart in terms of their molecular weight. However, as can be seen from Figure 14, with the inventive integrated continuous ultrafiltration process it is possible to adjust conditions to efficiently separate IL-2SA (approx. 16 kD) and green fluorescent protein GFP (27-30 kD). This higher than expected separation performance does allow for simultaneous concentration and purification.

20 Benefits of Device B and Respective Method

Figure 15 illustrates the performance of the inventive device B. Using a commercial convective adsorber (Mustang Q, Pall Corporation, 15 layer module), close to 100 consecutive adsorption/desorption cycles have been performed, thereby concentrating and purifying a recombinant FVIII variant from continuous perfusion culture. The average yield achieved was approximately 95% (spread results from assay variation), while the pressure remained relatively constant over the entire number of cycles performed. Therefore, it can be specified that at least 100 consecutive cycles can be performed before exchanging the adsorber set-up.

As has been shown in the detail description of the method of using inventive device B, the total mean residence time of the product in a present embodiment is less than 3 hours, before it is eluted in concentrated, purified and stabilized form in an appropriate buffer. This is significantly less than the more than 24 hours

residence time in a conventional batch isolation process performed once daily and therefore results in significantly higher yields of the inherently labile protein products. In a present embodiment described before, approximately 13 cycles are performed per day, which means in context of Figure 15 that the semi-continuous adsorber assembly would need to be exchanged only every 7-8 days, which is done without compromising sterility and continuity of operation.

Figure 16 shows an example of the UV and conductivity profile over a single typical adsorption/desorption and regeneration cycle with device B. It can be seen that more than 450 adsorber volumes (CVs) can be loaded, while the product elutes in a very sharp peak. Contaminants are removed significantly in the flow through during the loading phase, as well as, during the wash and the strip (regeneration phase).

Figure 17 illustrates the purification performance of the inventive process comprising semi-continuous convective adsorption/desorption. An example SDS page gel of a FVIII variant isolate is shown. As can be seen, the eluate fractions, which include 95% of the loaded FVIII variant (as determined by separate activity assay), contain significantly less protein than the load and are thus purified. No additional degradation bands are visible in the eluate (isolate), indicating excellent product quality.

In summary, the inventive device B is able to achieve similar purification performance as comparable batch processes, while at the same time minimizing yield losses for inherently unstable protein products, as well as, product quality issues, due to the minimization of product residence time. At the same time, labor costs are dramatically reduced due to the inherently high degree of automation of the inventive process, requiring minimal operator intervention.

Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of understanding, it will be apparent to those skilled in the art that certain changes and modifications may be practiced. Therefore, the description and examples should not be construed as limiting the scope of the invention, which is delineated by the appended claims.

Accordingly, it is to be understood that the embodiments of the invention herein providing for an improved method of filtration to generate a high yield of a molecule of interest from a given feedstream are merely illustrative of the application of the principles of the invention. It will be evident from the foregoing
5 description that changes in the form, methods of use, and applications of the elements of the disclosed may be resorted to without departing from the spirit of the invention, or the scope of the appended claims.

47

CLAIMS

We claim:

- 5 1. A process for purifying a molecule of interest from a heterogeneous clarified fluid mixture, comprising:
 filtering a heterogeneous clarified fluid mixture by continuous ultrafiltration at a specific flow rate below the transition point of the molecule of interest in the pressure-dependent region of the flux versus TMP curve, wherein the specific flow rate is maintained substantially constant throughout the continuous ultrafiltration.
- 10 2. The process according to claim 1, further comprising filtering the clarified mixture at a specific flow rate that produces a wall concentration less than about 20% greater than the retentate concentration.
- 15 3. The process according to claim 1, further comprising filtering the clarified mixture at a specific flow rate that produces a wall concentration less than about 15% greater than the retentate concentration.
- 20 4. The process according to claim 1, further comprising filtering the clarified mixture at a specific flow rate that produces a wall concentration less than about 10% greater than the retentate concentration.
5. The process according to claim 1, further comprising:
25 filtering the clarified fluid mixture through an ultrafiltration membrane having an area in square meters approximately equal to between 0.1 to 2 times the volumetric flow rate of the clarified fluid mixture in liters/hour.
6. The process according to claim 5, wherein the ultrafiltration
30 membrane has an area in square meters approximately equal to between 0.3 to 1 times the volumetric flow rate of the clarified fluid mixture in liters/hour.

9

48

7. A process for purifying a protein of interest from a heterogeneous tissue culture fluid mixture, comprising:

- (a) producing by a continuous perfusion fermentation process a heterogeneous tissue culture fluid mixture containing a protein of interest;
- 5 (b) transferring the tissue culture fluid mixture to a continuous particle removal process integrated with the continuous perfusion fermentation process;
- (c) removing particulate contaminants from the tissue culture fluid in the continuous particle removal process to produce a clarified tissue culture fluid containing the protein of interest;
- 10 (d) transferring the clarified tissue culture fluid to a continuous purification process integrated with the continuous particle removal process; and
- (e) purifying the protein of interest from the clarified tissue culture fluid in the continuous purification process;

wherein the specific flow rate of the mixture through the continuous
15 perfusion fermentation process, continuous particle removal process and continuous purification process is maintained substantially constant.

8. The process according to claim 7, wherein the continuous purification process is ultrafiltration.

20

9. The process according to claim 8, further comprising filtering the clarified tissue culture mixture at a specific flow rate that produces a wall concentration less than about 20% greater than the retentate concentration.

25

10. The process according to claim 8, further comprising filtering the clarified tissue culture mixture at a specific flow rate that produces a wall concentration less than about 15% greater than the retentate concentration.

30

11. The process according to claim 8, further comprising filtering the clarified tissue culture mixture at a specific flow rate that produces a wall concentration less than about 10% greater than the retentate concentration.

49-49

12. The process according to claim 8, further comprising filtering the clarified tissue culture mixture through an ultrafiltration membrane having an area in square meters approximately equal to between 0.1 to 2 times the volumetric flow rate from the continuous perfusion fermentation in liters/hour.

5

13. The process according to claim 8, further comprising filtering the clarified tissue culture mixture through an ultrafiltration membrane having an area in square meters approximately equal to between 0.3 to 1 times the volumetric flow rate from the continuous perfusion fermentation in liters/hour.

10

14. A process for purifying a protein of interest from a heterogeneous tissue culture fluid mixture, comprising:

- (a) producing by a continuous perfusion fermentation process a heterogeneous tissue culture fluid mixture containing a protein of interest;
- 15 (b) transferring the tissue culture fluid mixture to a continuous particle removal process integrated with the continuous perfusion fermentation system;
- (c) removing particulate contaminants from the tissue culture fluid in the continuous particle removal process to produce a clarified tissue culture fluid containing the protein of interest;
- 20 (d) transferring the clarified tissue culture fluid to a surge vessel integrated with the continuous particle removal process;
- (e) intermittently transferring the clarified tissue culture fluid to a purification process integrated with the surge vessel; and
- (e) purifying the protein of interest from the clarified tissue culture fluid
- 25 in the purification system to produce a sterile, particle-free, concentrated and partially purified product isolate containing the protein of interest;

wherein the specific flow rate of the mixture through the continuous perfusion fermentation process and continuous particle removal process is maintained substantially constant.

30

15. A process according to claim 14, wherein the purification process is convective adsorption/desorption.

16. An apparatus for separating a protein of interest from a heterogeneous tissue culture fluid mixture, comprising:

- (a) a continuous perfusion fermentation system;
 - (b) a continuous particle removal system integrated with the perfusion fermentation system; and
 - (c) a continuous purification system integrated with the particle removal system;
- wherein the apparatus is maintained under sterile conditions.

17. The apparatus according to claim 16, comprising:

- (a) a continuous perfusion fermentation system adapted to continuously produce a tissue culture fluid containing a protein of interest at a substantially constant volumetric flow rate;
 - (b) a continuous particle removal system integrated with and adapted to continuously receive the tissue culture fluid from the perfusion fermentation system and continuously produce a clarified tissue culture fluid; and
 - (c) a continuous purification system integrated with and adapted to continuously receive the clarified tissue culture fluid from the particle removal system and continuously produce a product isolate containing the protein of interest;
- wherein the apparatus is maintained under sterile conditions.

18. The apparatus of claim 17, wherein the ultrafiltration system comprises an ultrafiltration membrane having an area in square meters approximately equal to between 0.1 to 2 times the volumetric flow rate of the continuous perfusion fermentation in liters/hour.

19. The apparatus of claim 17, wherein the ultrafiltration system comprises an ultrafiltration membrane having an area in square meters approximately equal to between 0.3 to 1 times the volumetric flow rate of the continuous perfusion fermentation in liters/hour.

20. An apparatus for separation of a protein of interest from a tissue culture fluid stream, comprising:
- (a) a continuous perfusion fermentation system;
 - (b) a continuous particle removal system integrated with the perfusion fermentation system; and
 - (c) an intermittent purification system integrated with the particle removal system;
- wherein the apparatus is maintained under sterile conditions.
21. The apparatus according to claim 20, comprising:
- (a) a perfusion fermentation system adapted to continuously produce a tissue culture fluid containing a protein of interest;
 - (b) a particle removal system integrated with and adapted to continuously receive the tissue culture fluid from the reactor and continuously produce a clarified tissue culture fluid;
 - (c) a surge vessel integrated with and adapted to continuously receive the clarified tissue culture fluid from the particle removal system and semi-continuously release the clarified tissue culture fluid, and
 - (d) a purification system integrated with and adapted to semi-continuously receive the clarified tissue culture fluid from the surge vessel;
- wherein the apparatus is adapted to maintain sterile conditions.
22. The apparatus of claim 20, wherein the purification system comprises a convective adsorption/desorption system.

Figure 1: Schematic of conventional continuous perfusion process followed by 3 physically and logistically segregated isolation process steps (batch harvest collection, batch particle removal and batch concentration/purification)

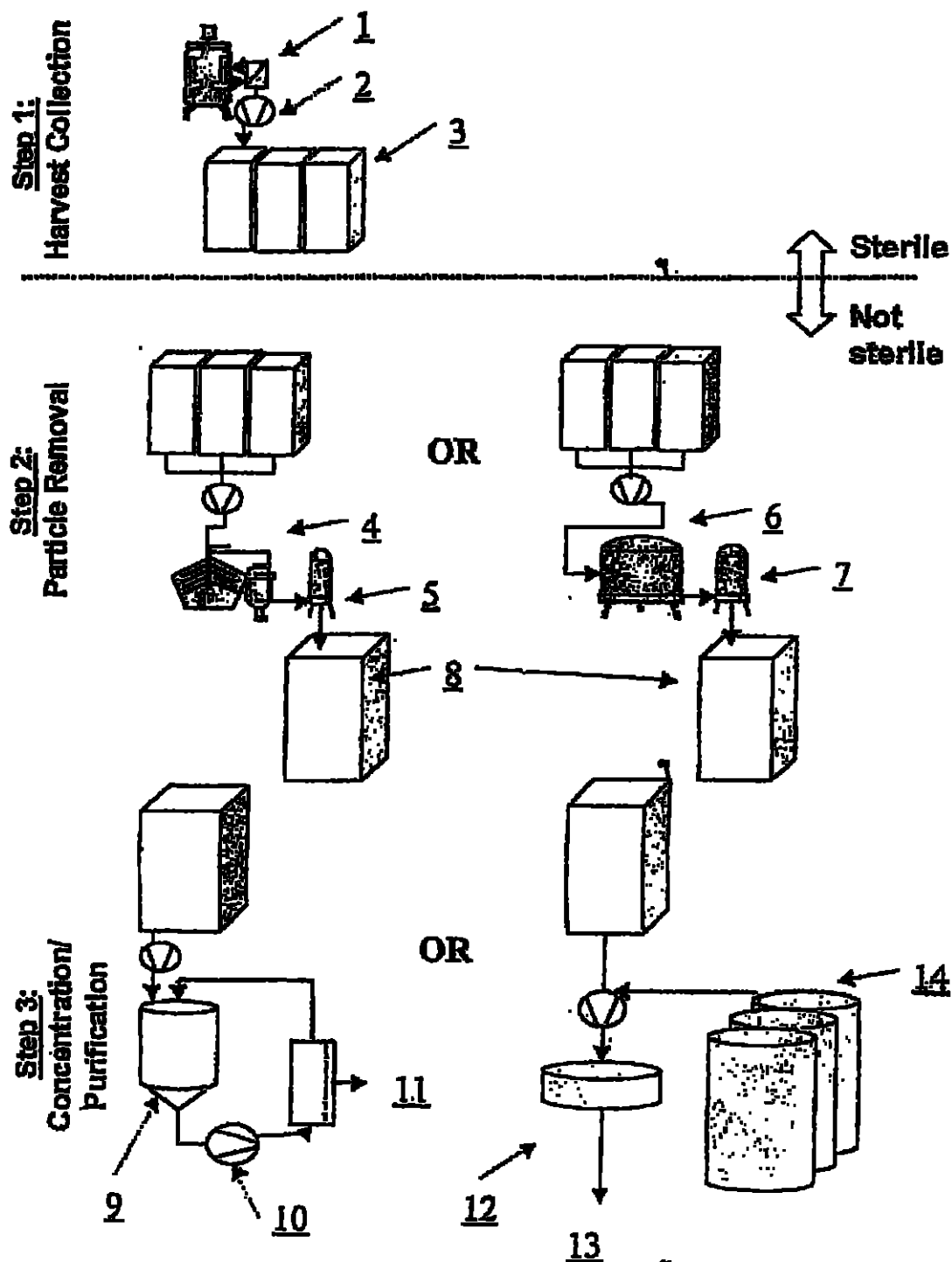


Figure 3: Schematic representation of 2 embodiments of inventive device A for continuous, integrated and sterile manufacturing. Schematic of embodiment A1 shown on left hand side and schematic of embodiment A2 shown on right hand side.

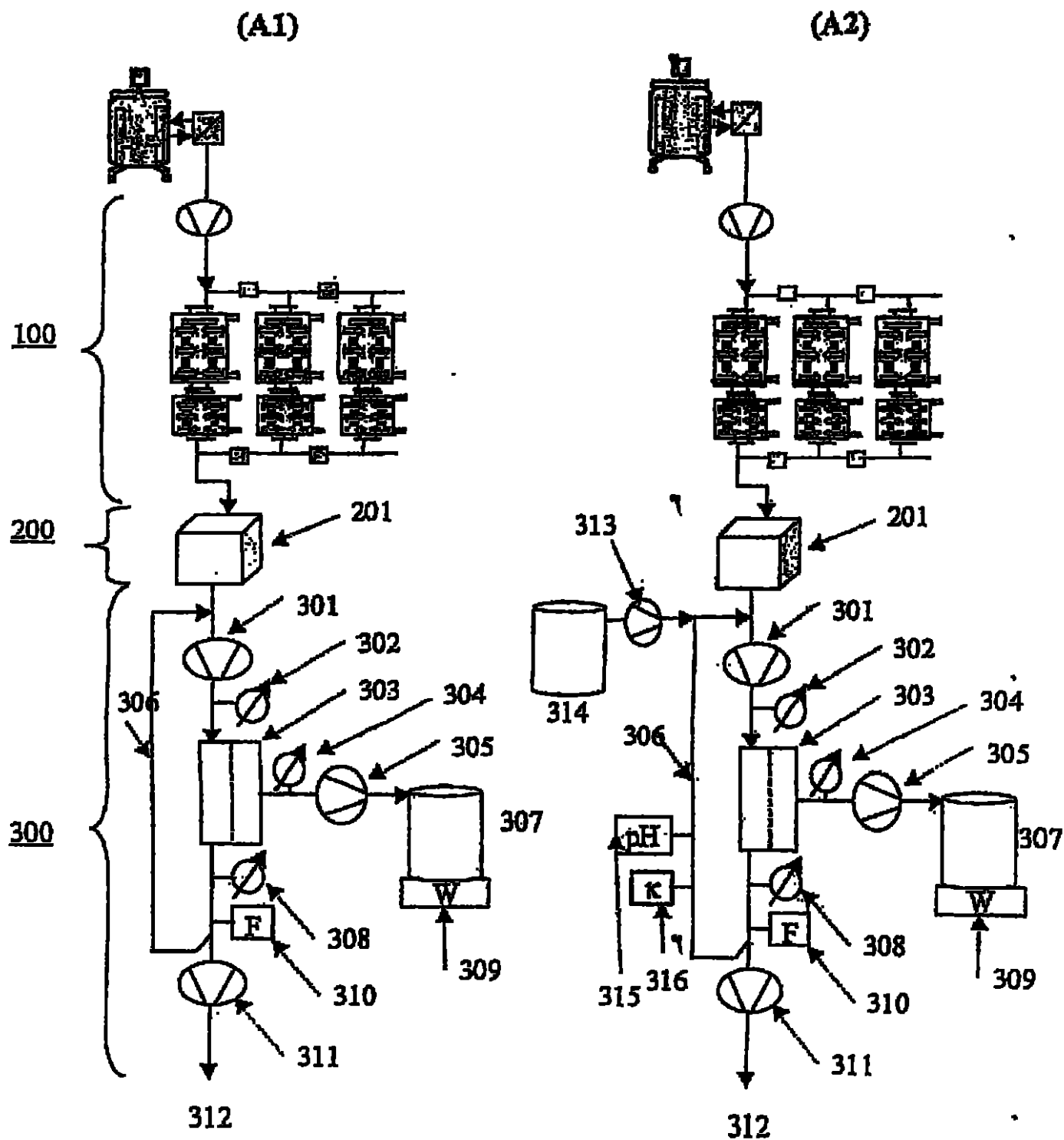


Figure 3: Schematic representation of 2 embodiments of inventive device B for continuous, integrated and sterile manufacturing. Schematic of embodiment B1 shown on left hand side and schematic of embodiment B2 shown on right hand side.

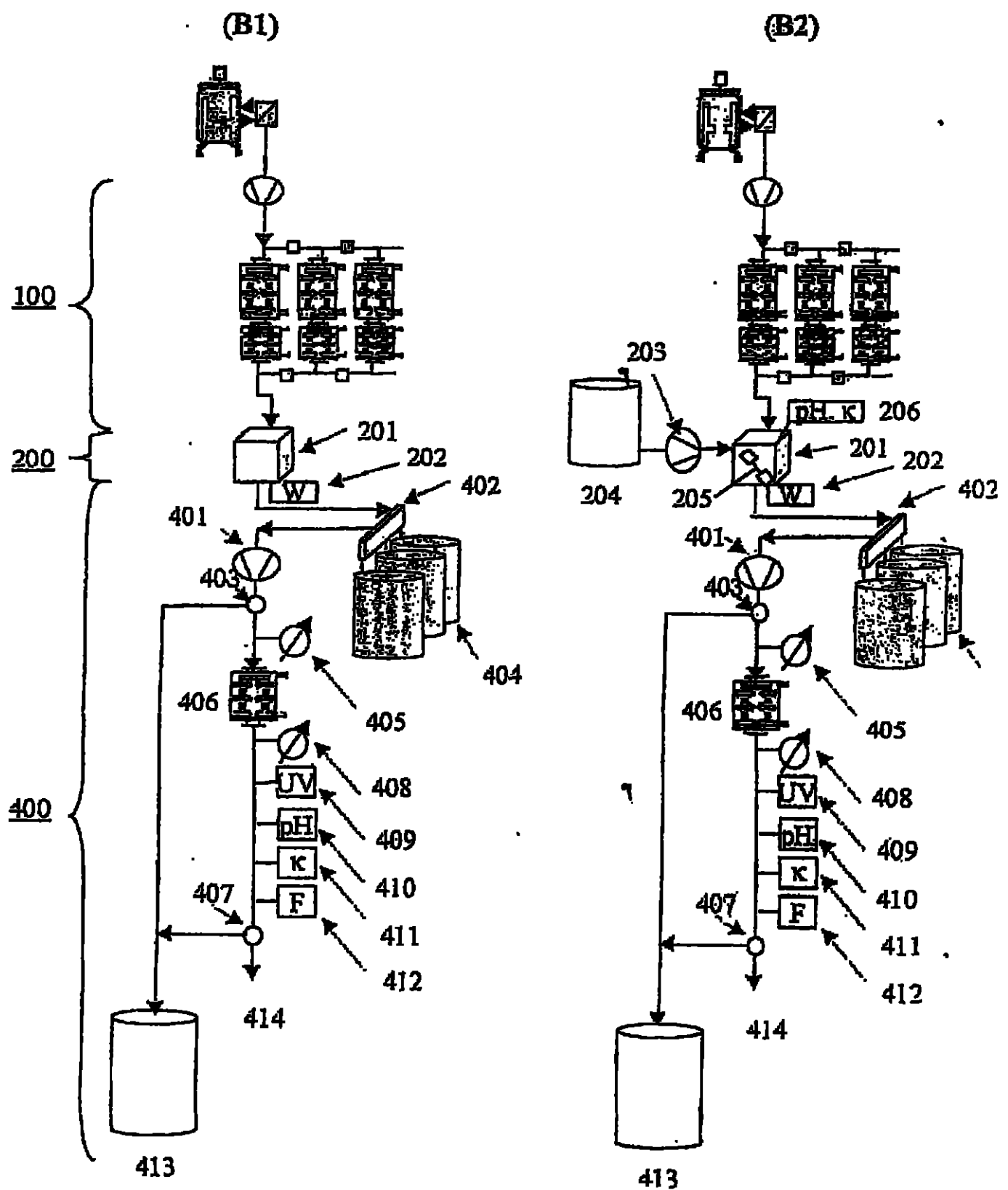
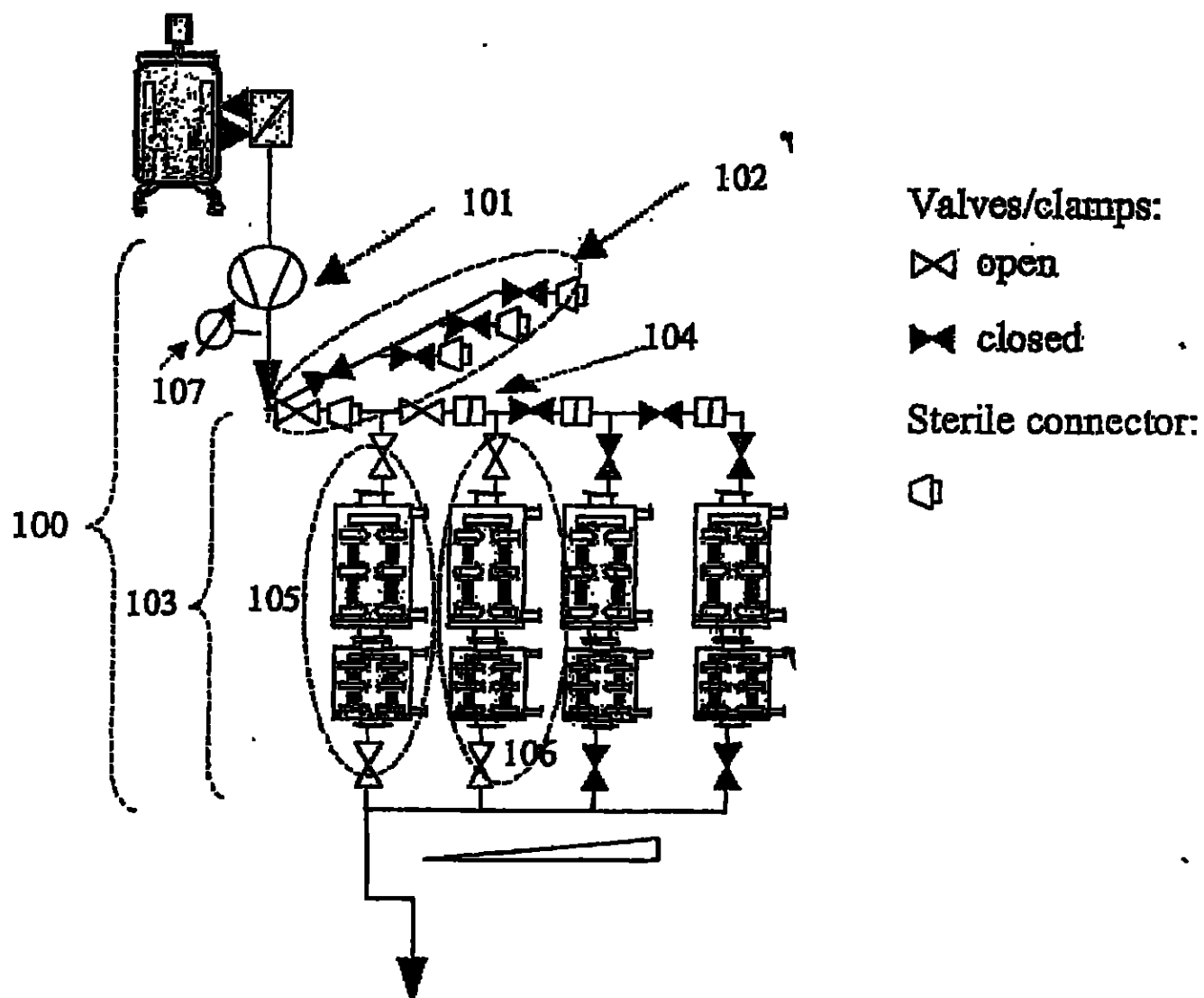


Figure 4: Schematic of an embodiment of inventive integrated, continuous particle removal system (100), an element of both inventive device A and inventive device B.



5/17

Figure 5: Schematic representations of additional embodiments of inventive device A which combine multiple elements to either increase overall plant capacity (A3) or concentration and separation performance (A4).

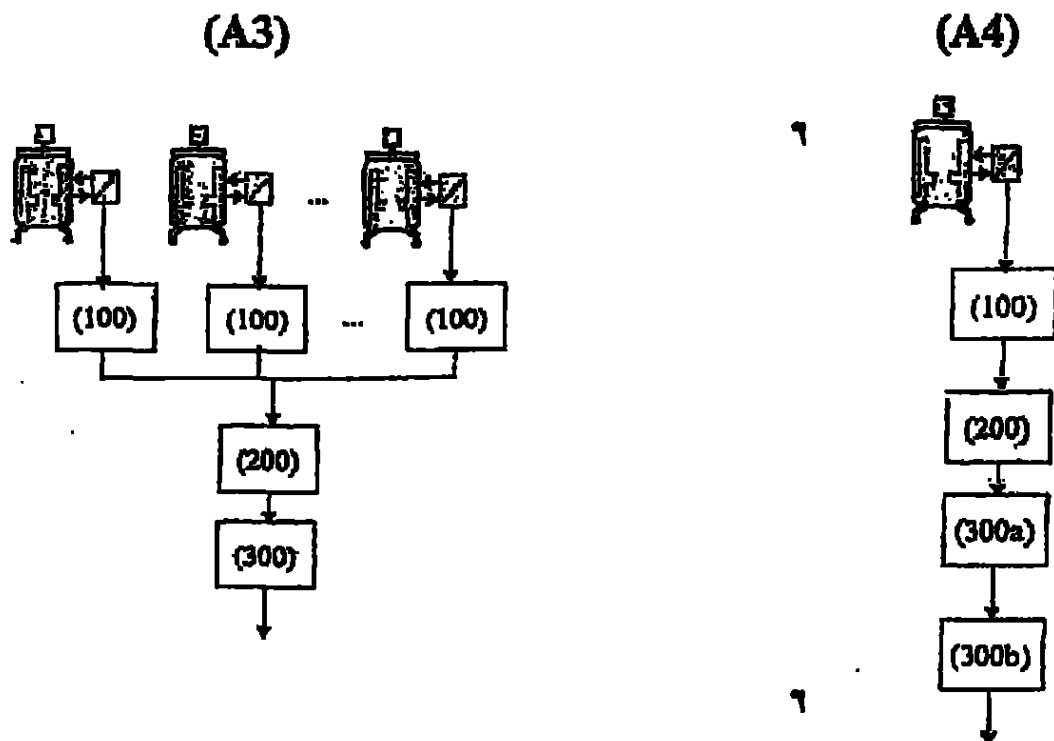


Figure 6: Schematic representations of additional embodiments of inventive device B.

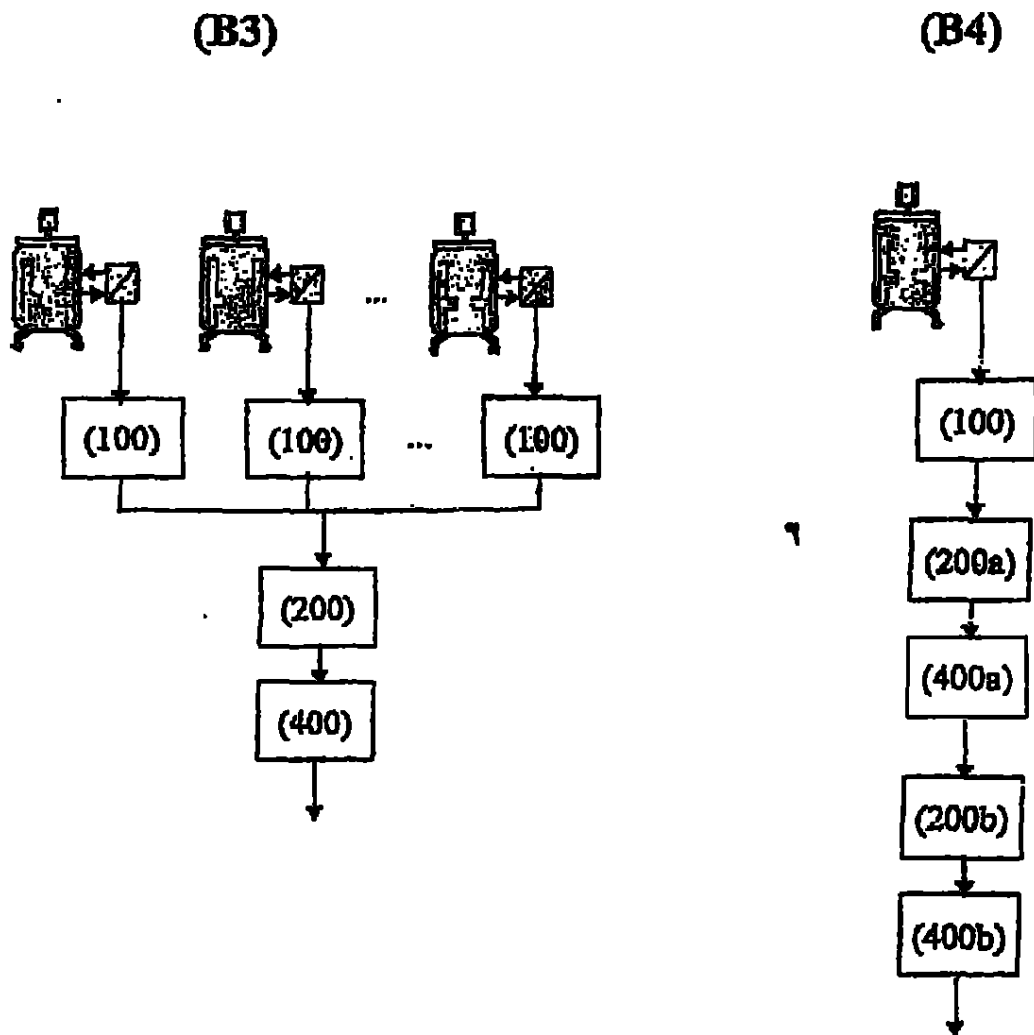
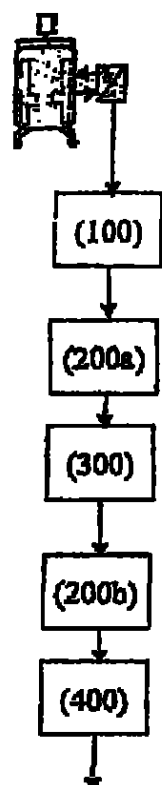
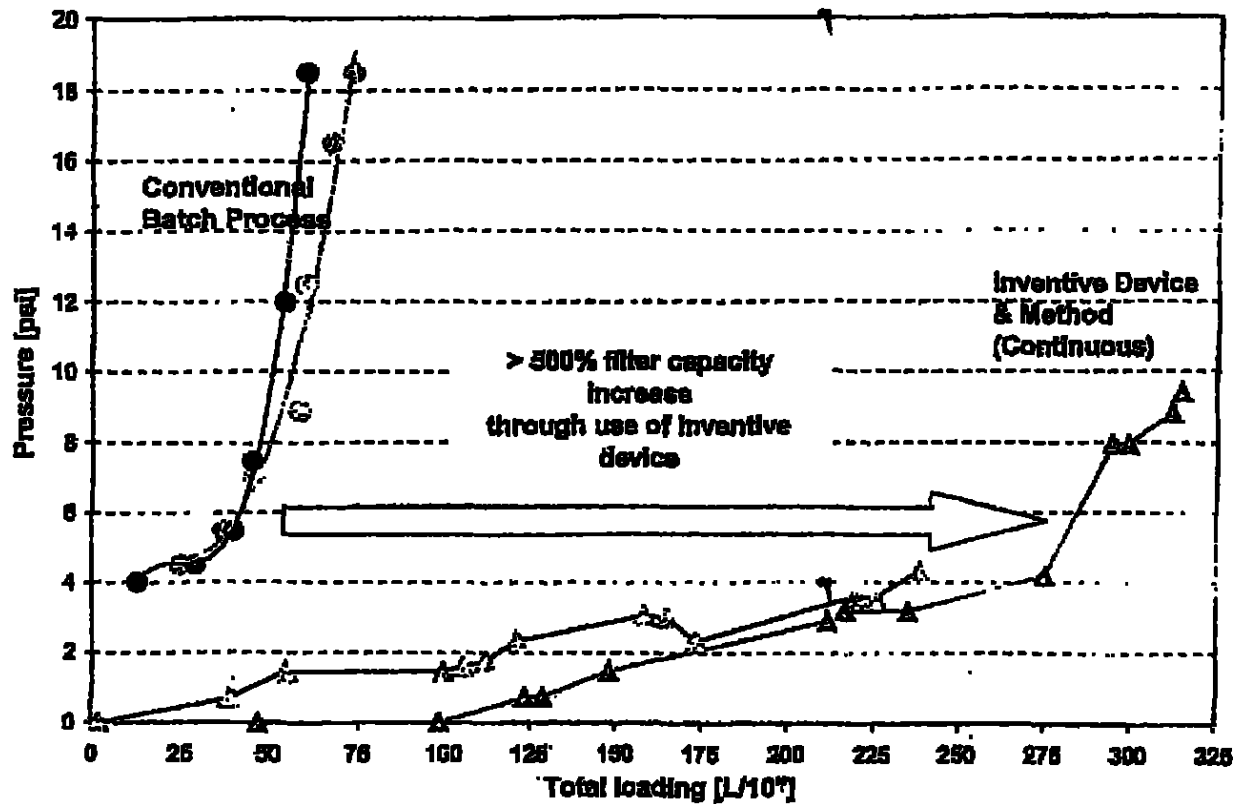


Figure 7: Additional embodiment of inventive devices that combines the elements of device A and device B in series to increase overall concentration and separation performance.



8/17

Figure 3: Example comparison of total load capacities per 10" of filter capsule for conventional batch process and embodiment of inventive device and method for continuous particle removal (integrated continuous filtration process) using identical commercial filter capsules. Example method producing recombinant blood coagulation Factor VIII shown.



9/17

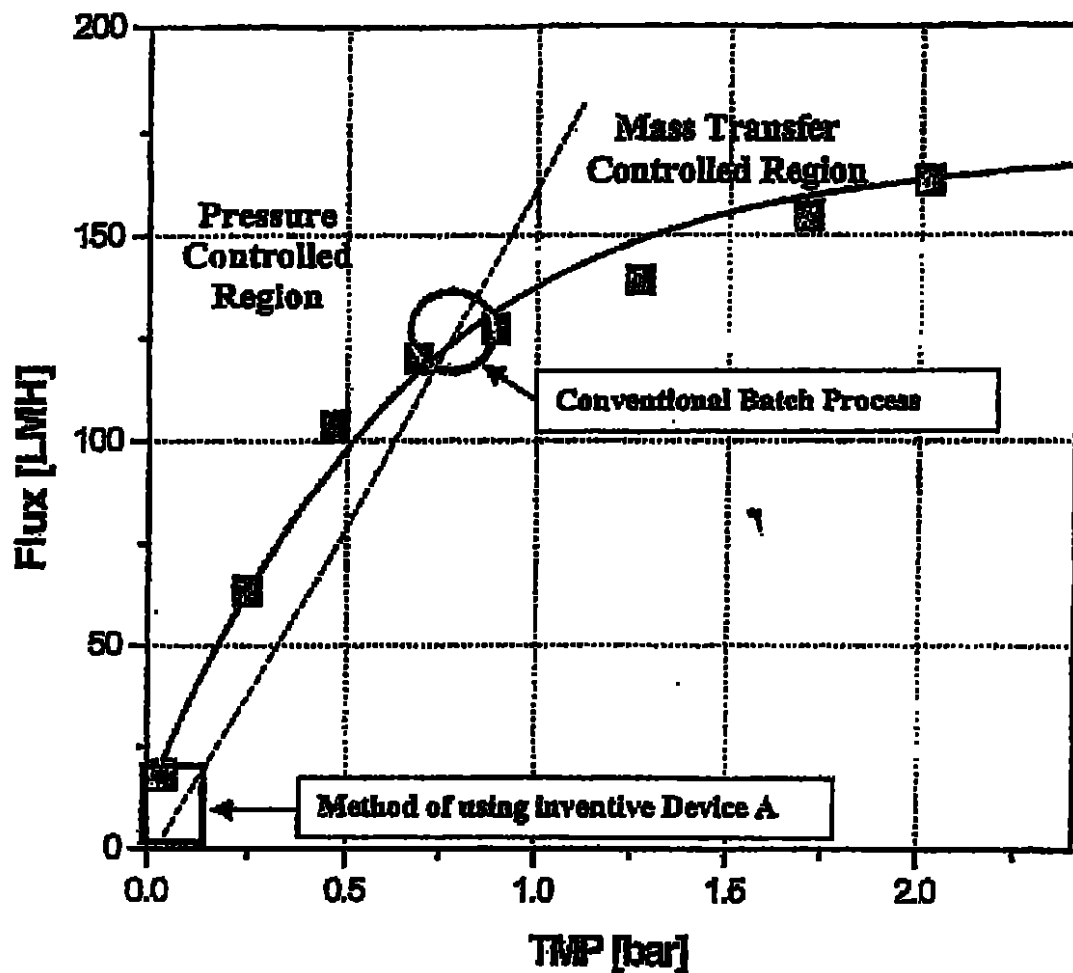


Figure 9: Example of pressure-flux curve (specific permeate flux in LMH = liters/hour/m² over transmembrane pressure) and determination of operation point. The circle shows the typical operation point that will be adjusted via the TMP for conventional batch processes. The rectangle shows the operational region that will be adjusted via the permeate pump as per the method of using the inventive device A.

10/17

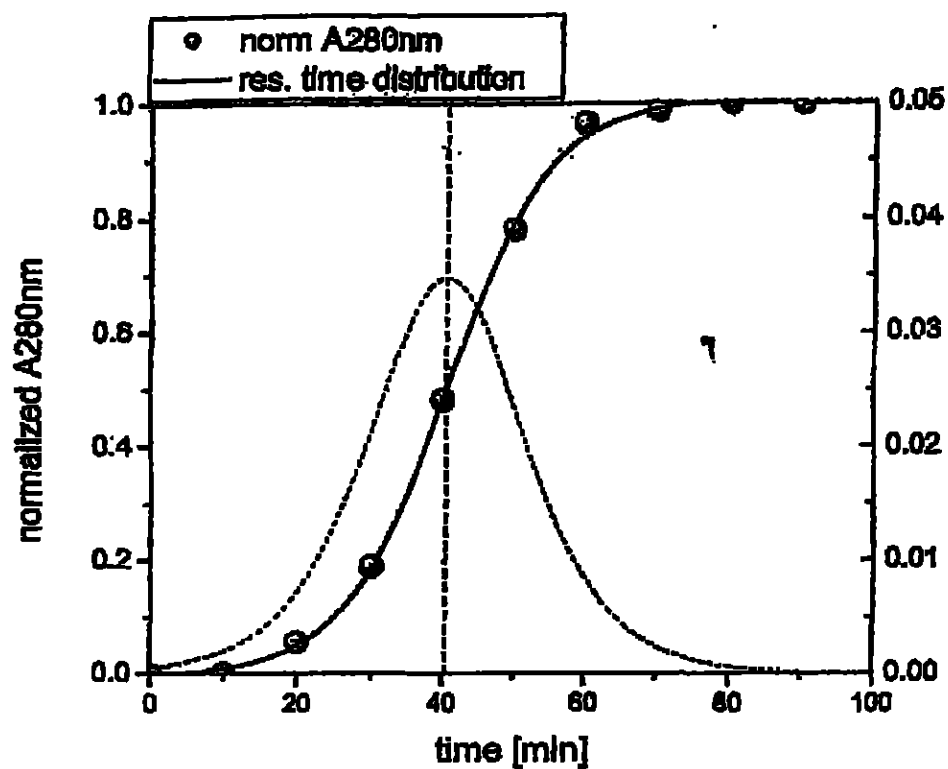


Figure 10: Example of residence time distribution and mean residence time of integrated continuous UF system (300) as per method of using inventive device A. Measured for disposable continuous system with 290 cm² module (62.5 cm length), 120 LMH crossflow, 0.2 LMH retentate flow, 2 LMH permeate flow.

11/17

62

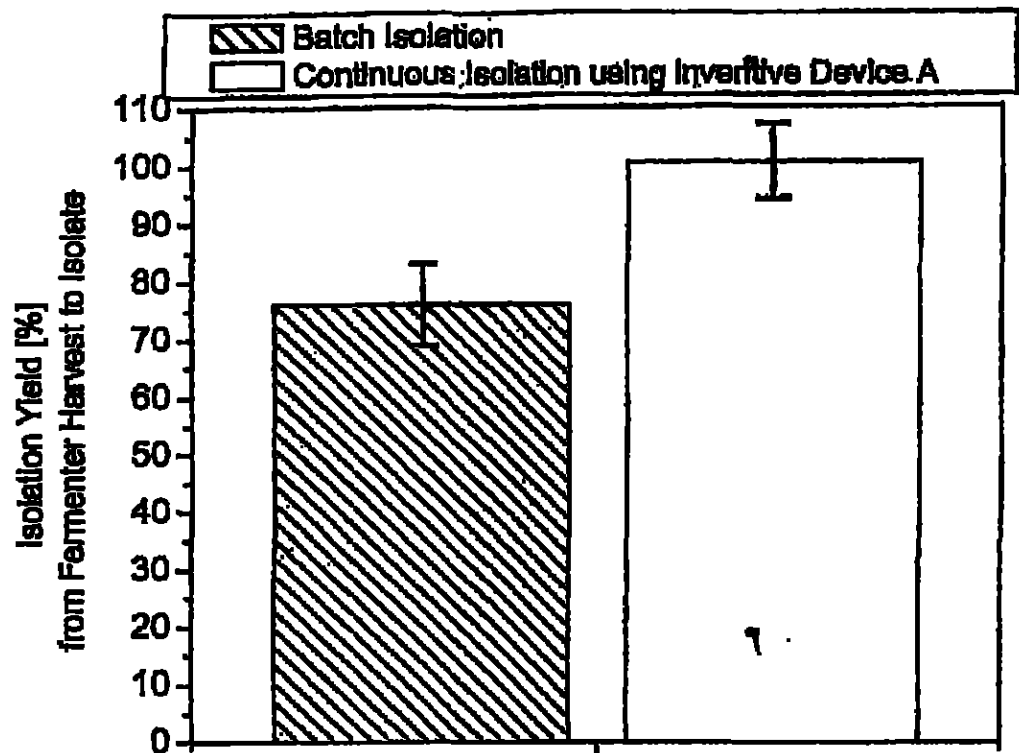


Figure 11: Example of isolation of rFVIII from plasma-protein free continuous perfusion fermentation using an embodiment of inventive device A. Comparison of average isolation yield of inventive continuous method compared to average yield of batch isolation, including one standard deviation spread. 3 consecutive batches were used for determining batch yield, while 3 consecutive points (days) were used for the continuous process.

12/17

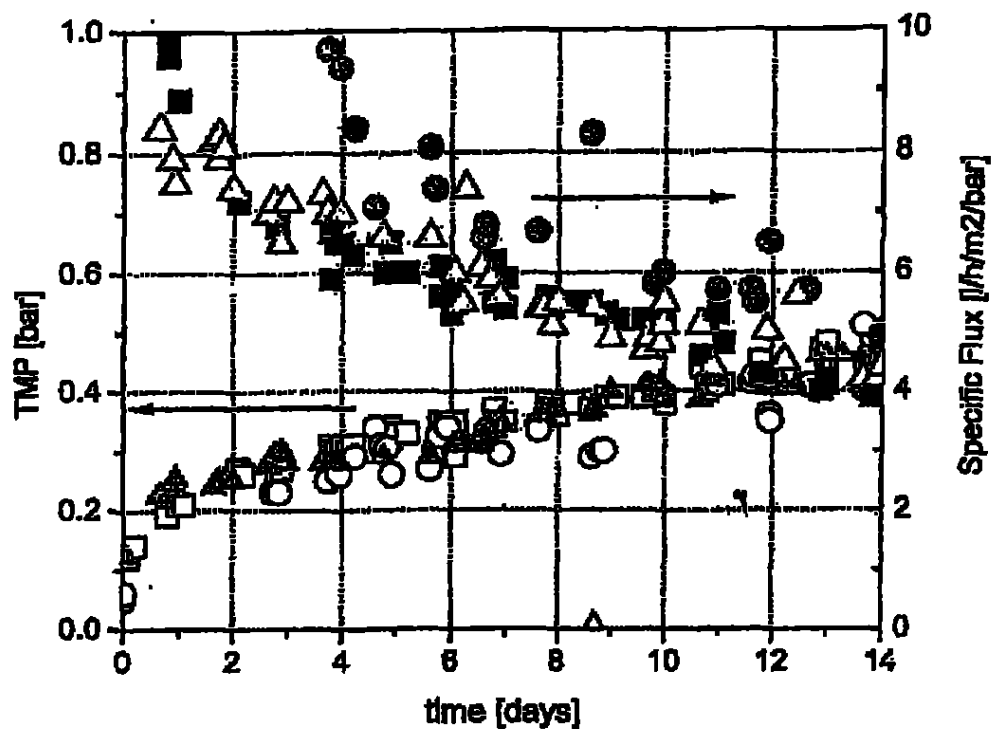


Figure 12: Examples of performance of inventive device A. Transmembrane pressure and specific flux of integrated continuous ultrafiltration system (300) as a function of continuous process time for 3 different examples shown. Triangles = 100 kD membrane, recombinant blood coagulation Factor VIII (rFVIII); Squares = 10 kD membrane, recombinant Interleukin-2; Circles = 50 kD membrane, genetically engineered glycoprotein ($M_r > 100$ kD). All examples shown are from plasma protein-free continuous perfusion fermentation.

13/17

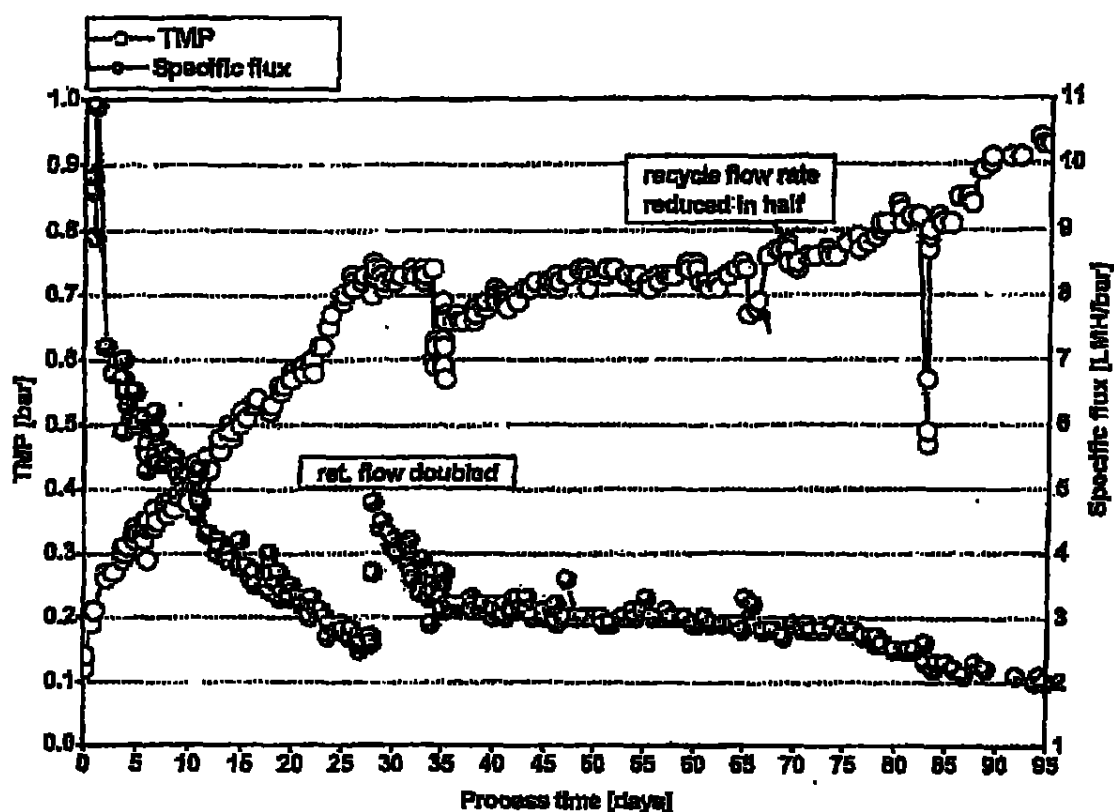


Figure 13: Example of long-term performance of inventive device A directly coupled to continuous perfusion fermentation of cell-line co-expressing 2 protein products (Green fluorescent protein GFP and IL-2SA). Transmembrane pressure and specific flux of inventive continuous ultrafiltration system (300) as a function of continuous process time shown. 10kD membrane was used.

14/17

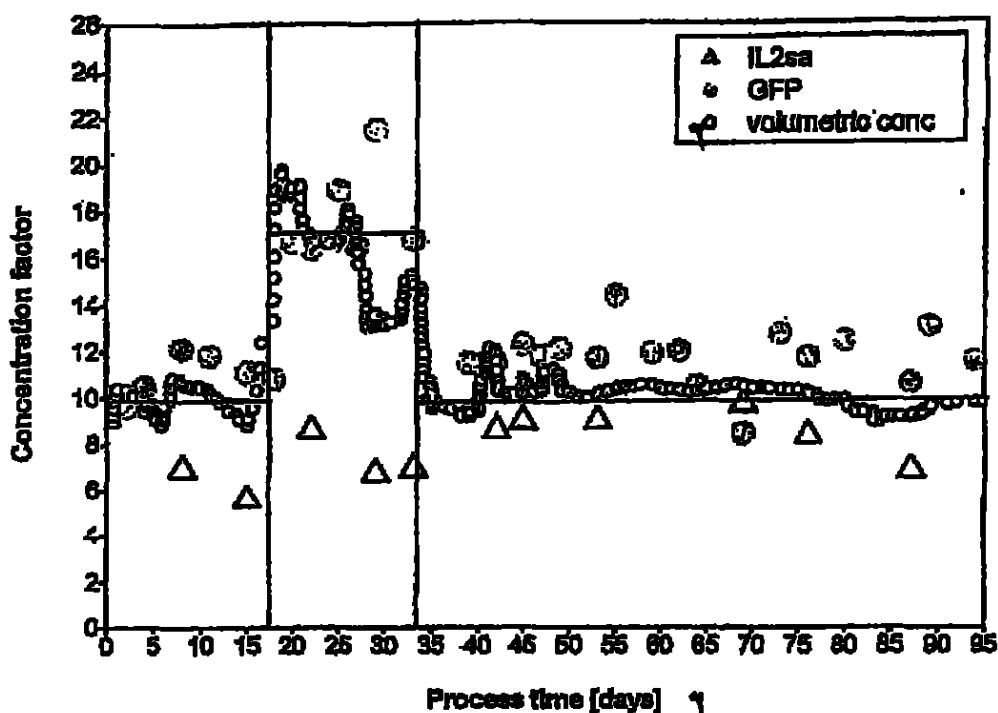


Figure 14: Example of long-term performance of inventive device A directly coupled to continuous perfusion fermentation of cell-line co-expressing 2 protein products (Green fluorescent protein GFP and IL-2SA). 10kD membrane was used. Concentration factor of both protein products, as determined by specific assays, and volumetric concentration factor shown as a function of continuous process time.

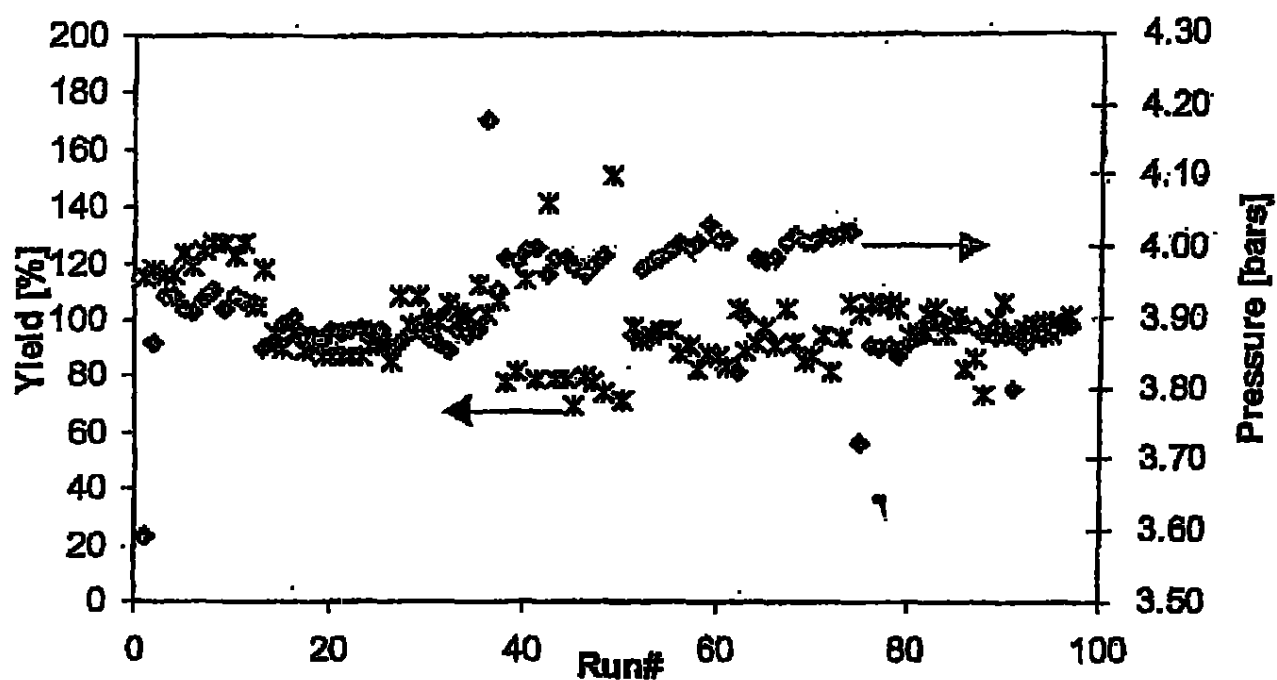


Figure 15: Example for performance of inventive device B. Yield and pressure drop over close to 100 consecutive adsorption/desorption cycles with convective adsorber (target protein: genetically engineered blood coagulation Factor FVIII variant; convective adsorber: commercial adsorber, Mustang Q, Pall Corporation).

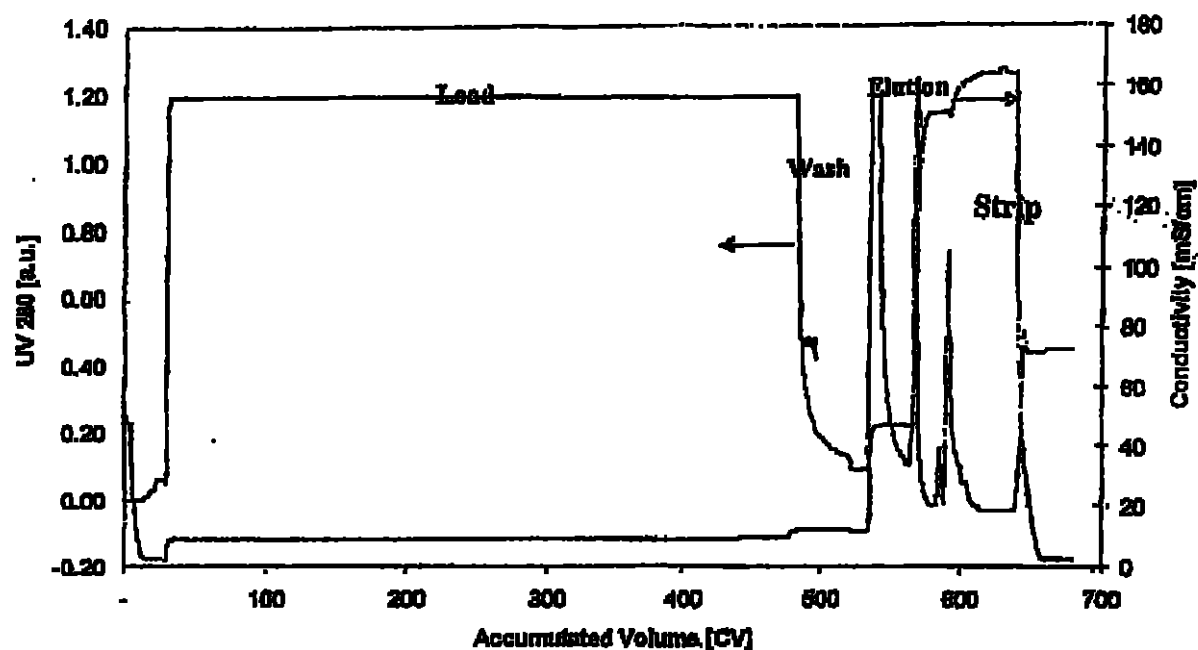
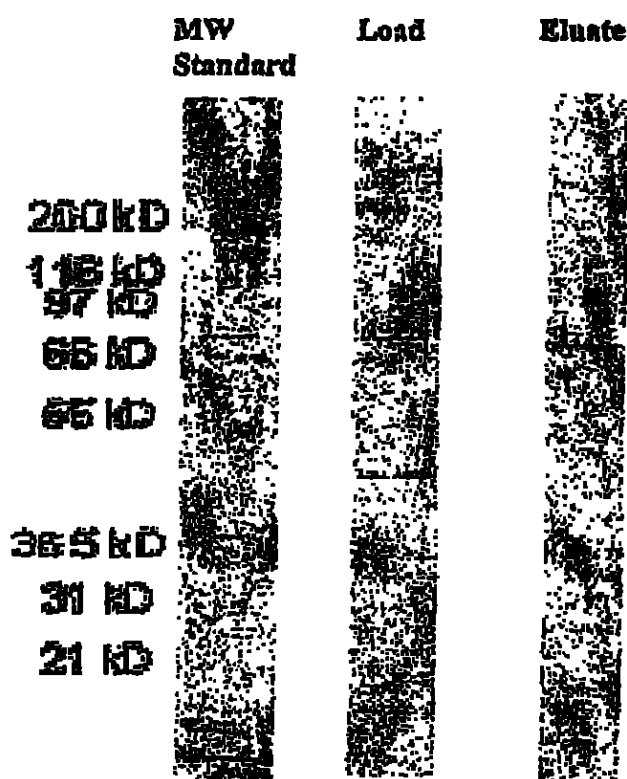


Figure 16: Example for performance of inventive device B. UV and conductivity profile during a typical adsorption/desorption cycle with convective adsorber (target protein: genetically engineered blood coagulation Factor FVIII variant; convective adsorber: commercial adsorber, Mustang Q, Pall Corporation).

17/17

Figure 17: Example for performance of inventive device B, SDS-Page gel (silver stained) of Load = clarified harvest continuously leaving the particle removal system (100) and semi-continuously loaded onto the convective adsorber system (400) and typical adsorption/desorption eluate shown. Target protein: genetically engineered blood coagulation Factor FVIII variant; convective adsorber: commercial adsorber, Mustang Q, Pall Corporation). Eluate was diluted back to load concentration before run on gel.



Mail Ledger	12/21/05
Docketed by	UB
Due Date	-
Client Matter	4993.0312

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

WIGHT, Christopher, L.
Holland & Hart LLP
555 - 17th Street, Suite 3200
Denver, CO 80201
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 05 December 2005 (05.12.2005)	
Applicant's or agent's file reference 49493.0312	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2005/035364	International filing date (day/month/year) 30 September 2005 (30.09.2005)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 30 September 2004 (30.09.2004)
Applicant BAYER HEALTHCARE LLC et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
30 September 2004 (30.09.2004)	60/614,995	US	21 November 2005 (21.11.2005)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer Arunkumar NAIR Facsimile No. (41-22) 338.87.40 Telephone No. +41 22 338 8157
---	---

70

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/US

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty.

For International Preliminary Examining Authority use only	
Identification of IPEA	Date of receipt of DEMAND
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION	
Applicant's or agent's file reference 49508.0007	
International application No. PCT/US2005/035364	International filing date (day/month/year) 30/09/2005
(Earliest) Priority date (day/month/year) 30/09/2004	
Title of invention METHODS AND APPARATUS FOR INTEGRATED CONTINUOUS MANUFACTURING OF BIOLOGICAL MOLECULES	
Box No. II APPLICANT(S)	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) BAYER HEALTHCARE LLC 511 Benedict Avenue Tarrytown, New York 10591 USA	Telephone No. (914) 524-2094
	Facsimile No. (914) 524-3594
	Teleprinter No.
	Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) VOGEL, Jens 189 Shoreline Ct. Richmond, California 94804 USA	
State (that is, country) of nationality: DE	State (that is, country) of residence: US
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) GIOVANNINI, Roberto 655 Vernon Street Oakland, California 94610 USA	
State (that is, country) of nationality: CH	State (that is, country) of residence: US
☒ Further applicants are indicated on a continuation sheet.	

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

KONSTANTINOV, Konstantin B.
116 Foxglove Ln.
Walnut Creek, California 94597
USA

State *(that is, country)* of nationality:
US

State *(that is, country)* of residence:
US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

NGUYEN, Huong
751 Maple Street
San Francisco, California 94112
USA

State *(that is, country)* of nationality:
US

State *(that is, country)* of residence:
US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

WU Paul
79 Bates Blvd.
Orinda, California 94563
USA

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:
US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

☐ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is ☒ agent ☐ common representativeand ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlierName and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation.
The address must include postal code and name of country.)

WIGHT, Christopher L.

Holland & Hart LLP

60 East South Temple, Suite 2000, P.O. Box 11583

Salt Lake City, Utah 84147-0583

USA

Telephone No.

(801) 799-5823

Facsimile No.

(801) 799-5700

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
31,680☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

Statement concerning amendments:

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filedthe description ☒ as originally filed☐ as amended under Article 34the claims ☒ as originally filed☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)☐ as amended under Article 34the drawings ☒ as originally filed☐ as amended under Article 342. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.3. ☐ Where the IPEA wishes to start the international preliminary examination at the same time as the international search in accordance with Rule 69.1(b), the applicant requests the IPEA to postpone the start of the international preliminary examination until the expiration of the applicable time limit under Rule 69.1(d).4. ☐ The applicant expressly wishes the international preliminary examination to start earlier than at the expiration of the applicable time limit under Rule 54b/s.1(a).

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: English

☒ which is the language in which the international application was filed☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search☐ which is the language of publication of the international application☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination

Box No. V ELECTION OF STATES

The filing of this demand constitutes the election of all Contracting States which are designated and are bound by Chapter II of the PCT.

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

- | | | |
|--|---|--------|
| 1. translation of international application | : | sheets |
| 2. amendments under Article 34 | : | sheets |
| 3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19 | : | sheets |
| 4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19 | : | sheets |
| 5. letter | : | sheets |
| 6. other (specify) | : | sheets |

For International Preliminary
Examining Authority use only

received	not received
----------	--------------

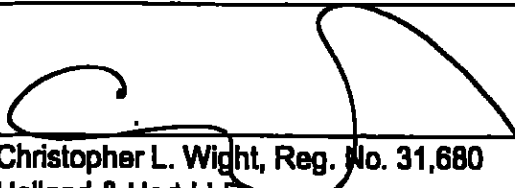
- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|--|---|
| 1. ☒ fee calculation sheet | 5. ☐ statement explaining lack of signature |
| 2. ☐ original separate power of attorney | 6. ☐ sequence listing in electronic form |
| 3. ☐ original general power of attorney | 7. ☐ tables in electronic form related to a sequence listing |
| 4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: | 8. ☒ other (specify): Transmittal Letter and Postcard |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the signature).


Christopher L. Wight, Reg. No. 31,680
Holland & Hart LLP
Attorneys for Applicants

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

- | | |
|--|--|
| 3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.
☐ The applicant has been informed accordingly. | 6. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a) and item 7 or 8, below, does not apply. |
| 4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5. | 7. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit under Rule 54bis.1(a) as extended by virtue of Rule 80.5. |
| 5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82. | 8. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a), the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82. |

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 49493.0312

Box No. I TITLE OF INVENTION

Methods and Apparatus for Integrated Continuous Manufacturing of Biological Molecules

Box No. II APPLICANT

☐ This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

BAYER HEALTHCARE LLC
511 Benedict Avenue
Tarrytown, New York 10591
U.S.A.

Telephone No.
(914) 524-2094Facsimile No.
(914) 524-3594

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant
for the purposes of:☐ all designated
States☒ all designated States except
the United States of America☐ the United States
of America only☐ the States indicated in
the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

VOGEL, Jens
189 Shoreline Ct.
Richmond, CA 94804

This person is:

☐ applicant only☒ applicant and inventor☐ inventor only (If this check-box is
marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

DE

State (that is, country) of residence:

DE

This person is applicant
for the purposes of:☐ all designated
States☐ all designated States except
the United States of America☒ the United States
of America only☐ the States indicated in
the Supplemental Box☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf
of the applicant(s) before the competent International Authorities as:☐ agent☐ common
representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

WIGHT, Christopher L.
Holland & Hart LLP
555 - 17th Street, Suite 3200
Denver, Colorado 80201
U.S.A.

Telephone No.
(801) 595-7823Facsimile No.
(801) 364-9124

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
31,680☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

GIOVANNINI, Roberto
655 Vernon Street
Oakland, CA 94610
U.S.A.

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

CH

State (that is, country) of residence:

CH

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☒ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

KONSTANTINOV, Konstantin B.
116 Foxglove Ln.
Walnut Creek, CA 94597
U.S.A.

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☒ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

NGUYEN, Huong
751 Maple Street
San Francisco, CA 94112
U.S.A.

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☒ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

WU, Paul
79 Bates Blvd.
Orinda, CA 94563
U.S.A.

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States☐ all designated States except the United States of America☒ the United States of America only☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Supplemental Box

If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.

1. If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No." (Indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:
 - (i) If more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;
 - (ii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;
 - (iii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;
 - (iv) If, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;
 - (v) If, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.
2. If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such a case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other patent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(iii) and 49bis.1(a) or (b)).
3. If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(iv) and 49bis.1(d)).

Continuation of Box No. IV:

Brian P. Kinneer, Reg. No. 43,717
 Francis A. Sirr, Reg. No. 17,285
 Chris Kullish, Reg. No. 33,056
 L. Grant Foster, Reg. No. 33,236
 James R. Farmer, Reg. No. 47,555
 D. Delos Larson, Reg. No. 46,118
 Kenneth C. Winterton, Reg. No. 48,040
 Ryan L. Marshall, Reg. No. 47,770
 Trent Butcher, Reg. No. 51,518
 Mark A. Miller, Reg. No. 44,944
 Shane P. Coleman, Reg. No. 44,623
 Jonathan R. Lee, Reg. No. 58581
 Holland & Hart LLP
 555 - 17th Street, Suite 3200
 Denver, Colorado 80201
 U.S.A.
 Phone: (801) 595-7823
 Fax: (801) 364-9124

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

- ☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection
- ☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection
- ☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other States.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 30 September 2004	60/814,995	US	9	
item (2)				
item (3)				

- ☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:

- ☐ all items ☒ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)).

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / US

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

Number of declarations

- | | | |
|---|--|---|
| ☐ Box No. VIII (i) | Declaration as to the identity of the inventor | : |
| ☐ Box No. VIII (ii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent | : |
| ☐ Box No. VIII (iii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application | : |
| ☐ Box No. VIII (iv) | Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) | : |
| ☐ Box No. VIII (v) | Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty | : |

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:		This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):		Number of items
(a) on paper, the following number of sheets:		1. ☒ fee calculation sheet		1
request (including declaration sheets)	5	2. ☐ original separate power of attorney		
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	41	3. ☐ original general power of attorney		
claims	5	4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:		
abstract	1	5. ☐ statement explaining lack of signature		
drawings	17	6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):		
Sub-total number of sheets	69	7. ☐ translation of international application into (language):		
sequence listing		8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material		
tables related thereto		9. ☐ sequence listing in electronic form (indicate type and number of carriers)		
(for both, actual number of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below)		(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application):		
Total number of sheets	89	(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter		
(b) ☐ only in electronic form (Section 801(a)(i))		(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column		
(i) ☐ sequence listing		10. ☐ tables in electronic form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)		
(ii) ☐ tables related thereto		(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)		
(c) ☐ also in electronic form (Section 801(a)(ii))		(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)		
(i) ☐ sequence listing		(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column		
(ii) ☐ tables related thereto		11. ☒ other (specify): Postcard receipt and Transmittal Letter....		2
Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the				
☐ sequence listing:				
☐ tables related thereto:				
(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)				
Figure of the drawings which should accompany the abstract: 8		Language of filing of the international application: English		

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).


 Christopher L. Wight, Reg. No. 31,880
 Holland & Hart LLP
 Attorneys for Applicants

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

DISPOSITIVOS Y MÉTODOS PARA LA FABRICACIÓN CONTINUA INTEGRADA DE MOLÉCULAS 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 TMP, caracterizado porque el promedio de flujo específico se mantiene sustancialmente constante en todo el proceso de ultrafiltración.

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 cm^2 (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 ensaycs 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 periodos 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.

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.

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 mas de 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/ m^2 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 m^2 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 autoclave 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 apertura 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 c_f se logra satisfaciendo $Q_i = 1/c_f * (Q_h + Q_b)$. 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 sorprendentemente 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/ m^2

k_d : coeficiente de transferencia de masa en litros/ hora/ m^2 .

c_{volumen} = 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_{pared} 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 $Carga \gg Q_h$.

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 adsorbedor- 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 cohcentración / 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 las 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 onca 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 dominio 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 más minimizados con el dispositivo A, que un volumen total mucho más 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 aún 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 série 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.

REIVINDICACIONES

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

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

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, además comprende filtrar la mezcla clarificada en un promedio de flujo específico que produce una concentración de pared menor a 20% aproximadamente mayor que la concentración de la retención.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, además comprende filtrar la mezcla clarificada en un promedio de flujo específico que produce una concentración de pared menor a 15% aproximadamente mayor que la concentración de la retención.

4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, además comprende filtrar la mezcla clarificada en un promedio de flujo específico que produce una concentración de pared menor a 10% aproximadamente mayor que la concentración de la retención.

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, además comprende: filtrar la mezcla de fluido clarificado a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados de aproximadamente 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 de aproximadamente 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 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.

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

9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, además comprende filtrar la mezcla de cultivo de tejido clarificada en un promedio de flujo específico que produce una concentración de pared menor a 20% aproximadamente mayor que la concentración de la retención.

10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, además comprende filtrar la mezcla de cultivo de tejido clarificada en un promedio de flujo específico que produce una concentración de pared menor a 15% aproximadamente mayor que la concentración de la retención.

11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, además comprende filtrar la mezcla de cultivo de tejido clarificada en un promedio de flujo específico que produce una concentración de pared menor a 10% aproximadamente mayor que la concentración de la retención.

12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, además comprende: filtrar la mezcla de cultivo de tejido clarificada a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados de aproximadamente igual a 0,1 a 2 veces el promedio de flujo volumétrico de la mezcla de fluido clarificado en litros / hora.

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, además comprende: filtrar la mezcla de cultivo de tejido clarificada a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados de aproximadamente igual a 0,3 a 1 vez el promedio de flujo volumétrico de la mezcla de fluido clarificado en litros / hora.

14. Un proceso para purificar una proteína de interés desde una mezcla de fluido de cultivo de tejido heterogéneo 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 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 aislado estéril, libre de partícula, 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 el proceso de extracción de partículas continua se mantiene sustancialmente constante.

15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14 caracterizado porque el proceso de purificación continua es adsorción/desorción convectiva.

16. Un aparato para separar una proteína de interés de una mezcla de cultivo de tejido heterogénea, que 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 continuo integrado con el sistema de extracción de partícula
- caracterizado porque el aparato se mantiene bajo condiciones estériles.

17. El aparato de acuerdo con la reivindicación 16 que comprende:

- (a) sistema de fermentación por perfusión continua adaptado para continuamente producir 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 continua integrada y adaptada para continuamente recibir el fluido de cultivo de tejido desde el sistema de fermentación por perfusión y continuamente producir un fluido de cultivo clarificado; y

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

18. El aparato de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado porque el sistema de ultrafiltración comprende una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados de aproximadamente igual a 0,1 a 2 veces el promedio de flujo volumétrico de la mezcla de fluido clarificado en litros / hora.

19. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado porque el sistema de ultrafiltración comprende una membrana de ultrafiltración que tiene un área en metros cuadrados de

aproximadamente igual a 0,3 a 1 vez el promedio de flujo volumétrico de la mezcla de fluido clarificado en litros / hora.

20. Un aparato para la separación de una proteína de interés desde una corriente de fluido de cultivo de tejido, que comprende:

(a) un sistema de fermentación por perfusión continua;

(b) un sistema de extracción de partículas continua 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.

21. El aparato de acuerdo con la reivindicación 20 que 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 y adaptado para continuamente recibir el fluido de cultivo de tejido desde un reactor y continuamente producir un fluido de cultivo de tejido clarificado;

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

(d) un sistema de purificación integrado y adaptado para semicontinualmente recibir el fluido de cultivo de tejido clarificado desde el recipiente de onda;

caracterizado porque el aparato está adaptado para mantenerse bajo condiciones estériles.

22. El aparato de la reivindicación 20, caracterizado porque el sistema de purificación comprende un sistema de adsorción/desorción convectiva.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con un proceso y aparato para purificar una molécula de interés desde una mezcla de fluido clarificado heterogéneo. El aparato de la invención generalmente comprende un sistema de fermentación por perfusión continua, un sistema de extracción de partícula continua integrada con el sistema de fermentación por perfusión; y un sistema de purificación continua integrado con el sistema de extracción de partículas que se mantiene bajo condiciones estériles. El proceso comprende filtrar una mezcla de fluido clarificado heterogéneo mediante ultrafiltración continua en un promedio de flujo específico debajo del punto de transición de la molécula de interés en la región dependiente de presión del flujo versus la curva de TMP, caracterizado porque el promedio de flujo específico se mantiene sustancialmente constante a través de la ultrafiltración continua.

Figura 1: Representación esquemática de proceso de perfusión continua convencional seguido por 3 pasos de proceso de aislamiento segregado físico y logísticamente (recolección de cosecha en serie, extracción de partícula en serie y concentración/ purificación en serie)

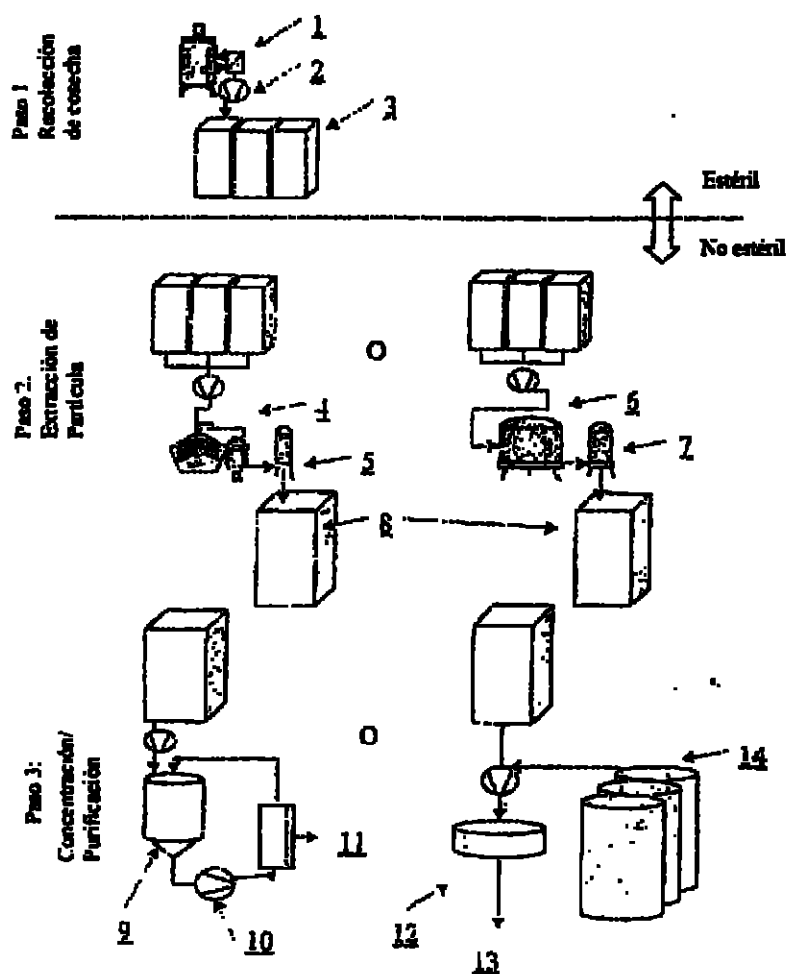
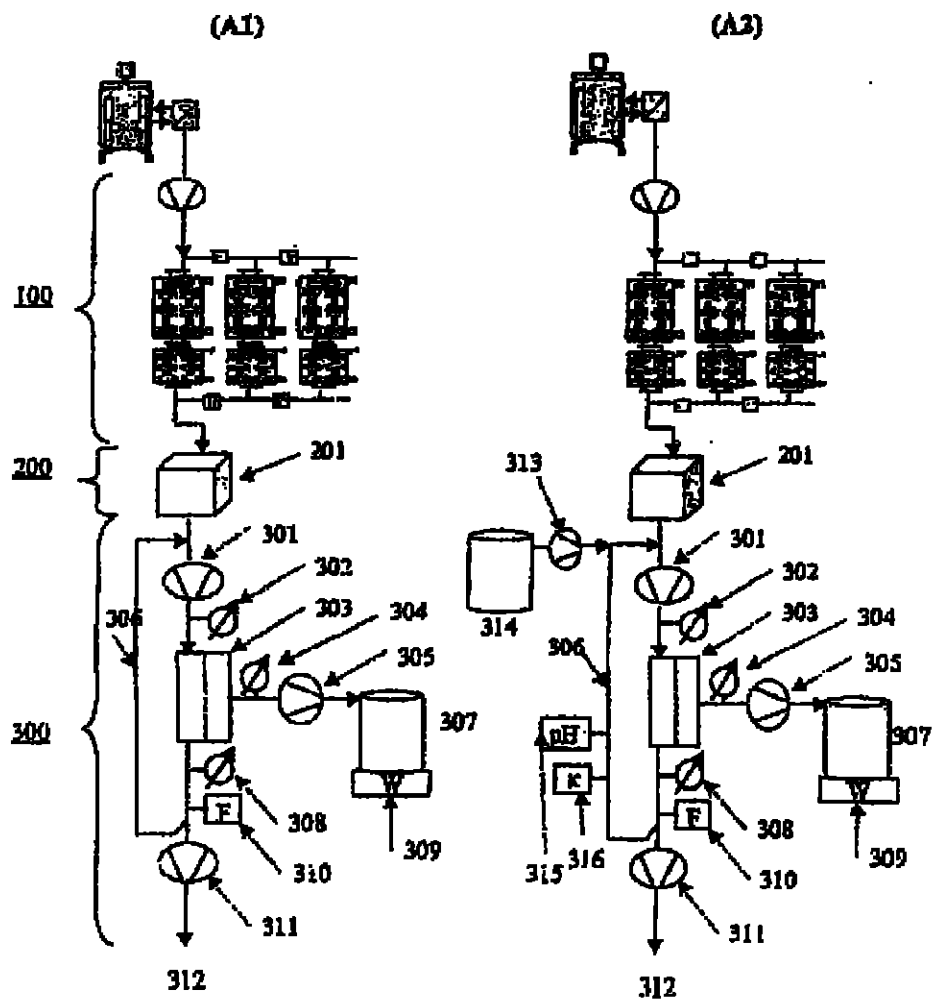


Figura 1 Representación esquemática de 2 incorporaciones de un dispositivo inventivo A para fabricación continua, integrada y estéril. Representación esquemática A1 mostrada en el lateral izquierdo y representación esquemática de la incorporación A2 mostrada en el lateral derecho.



3/17

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

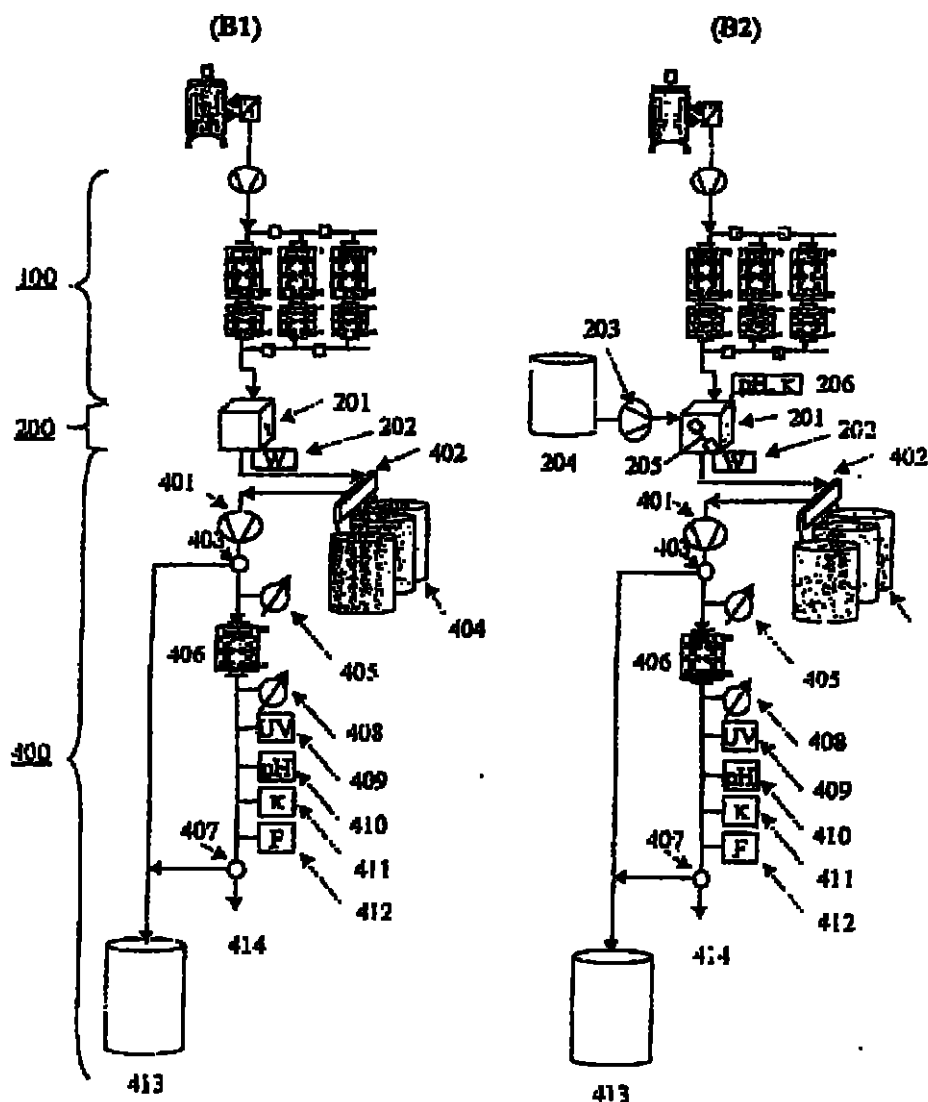


Figura 4: Representación esquemática de sistema de extracción de partículas continuo, integrado inventivo (100), un elemento del dispositivo inventivo y A del dispositivo inventivo B.

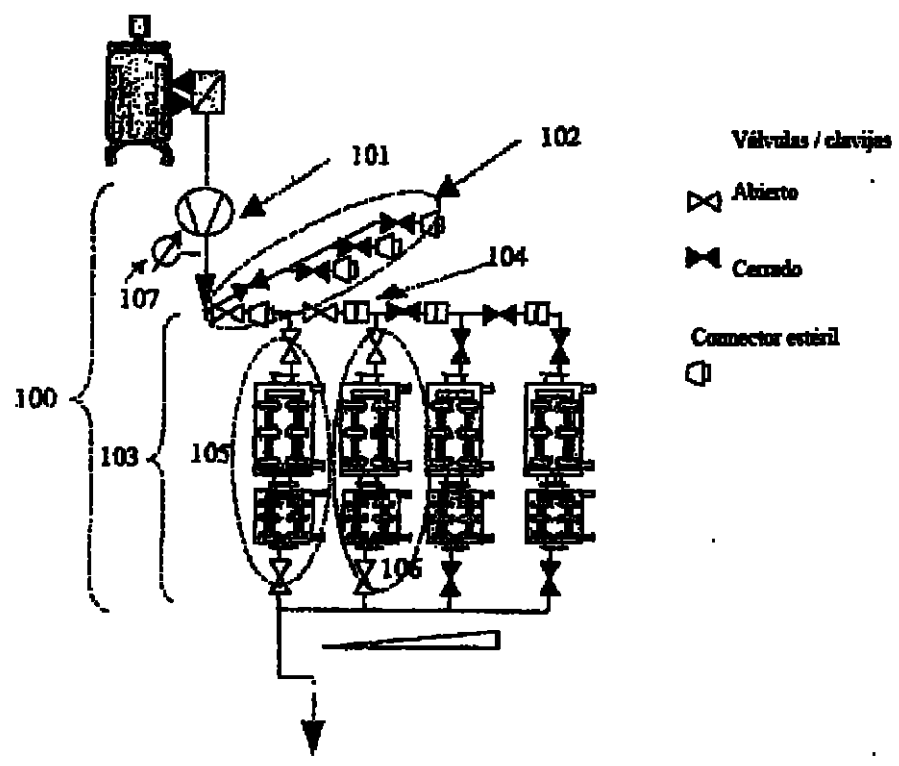


Figura 3: Representación esquemática de incorporaciones adicionales del dispositivo inventivo A que combina múltiples elementos para aumentar la capacidad de planta total (A3) o el rendimiento de concentración y separación (A4)

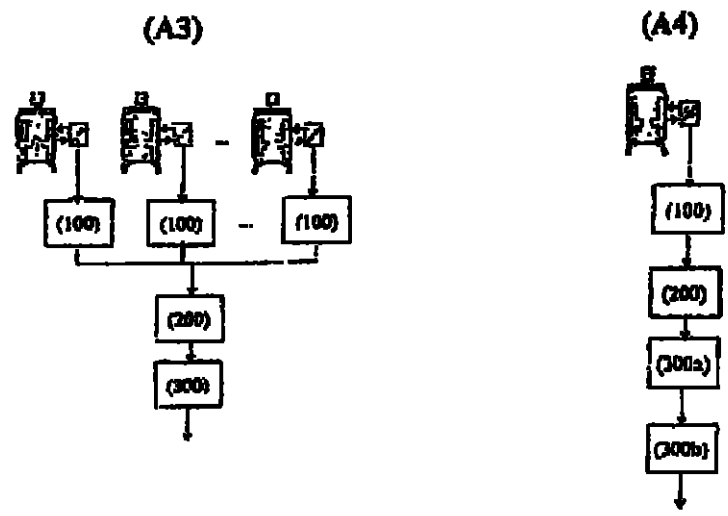


Figura 6: Representaciones esquemáticas de incorporaciones adicionales del dispositivo inventivo B.

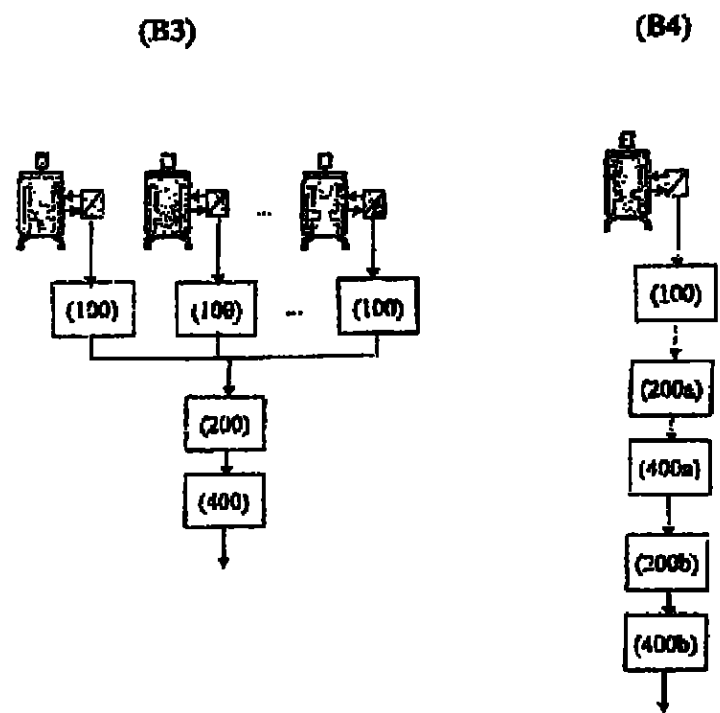
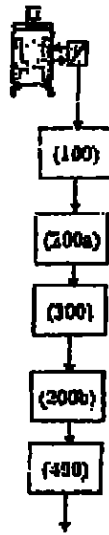
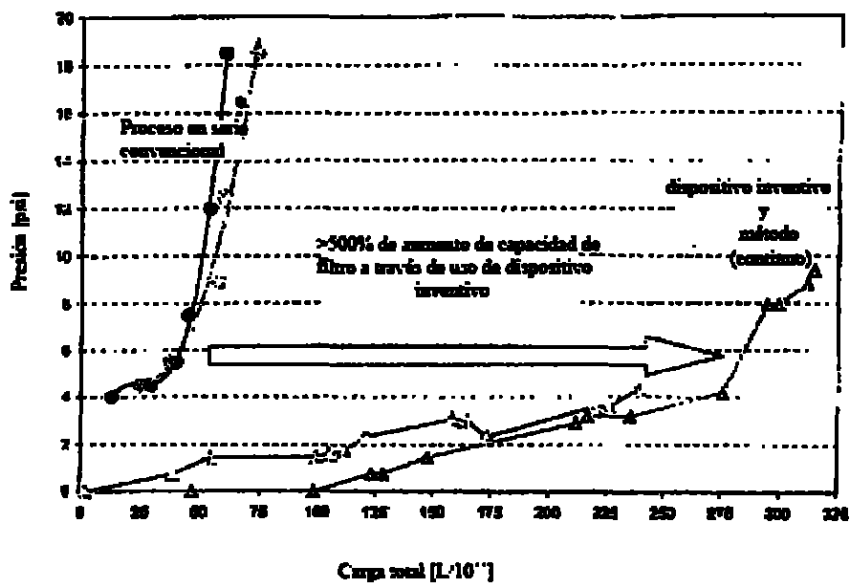


Figura 7: Incorporación adicional de dispositivos inventivos que combina los elementos del dispositivo A y el dispositivo B en series para aumentar el rendimiento de concentración y separación



8/17

Figura 8: Comparación ejemplar de las capacidades de carga total por 10" de diámetro de filtro para proceso convencional en serie e incorporación del dispositivo inventivo y método para la extracción de partícula continua (proceso de filtración continuo integrado) utilizando ejemplar de filtro comercial idénticos. Método ejemplar que produce Factor VIII recombinante de coagulación mostrado.



9/17

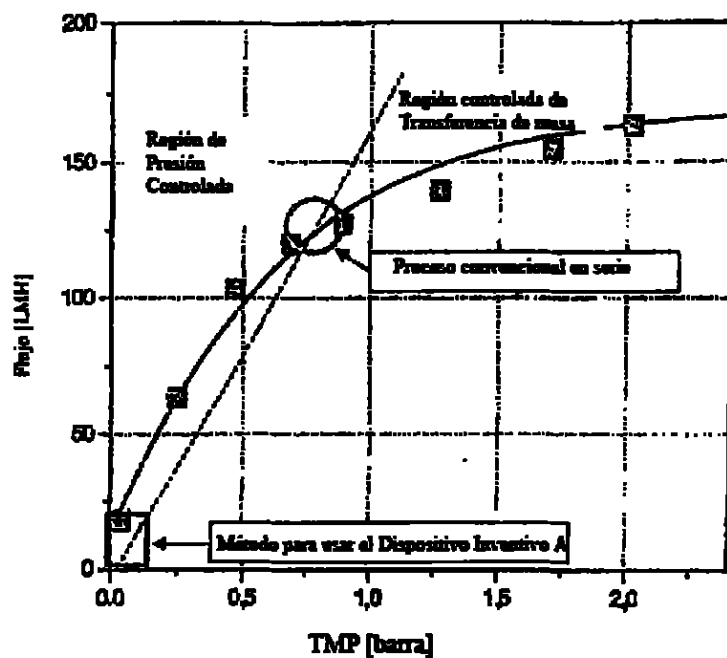


Figura 9: Ejemplo de curva de presión-flujo (flujo de permeado específico en LMH = litros/hora/m² sobre presión de transmembrana) y determinación del punto de funcionamiento. El círculo muestra el punto de funcionamiento típico que se ajustará mediante TMP para procesos en serie convencionales. El rectángulo muestra la región operacional que se ajustará mediante bomba de permeado según el método para utilizar el dispositivo invasivo A.

10/17

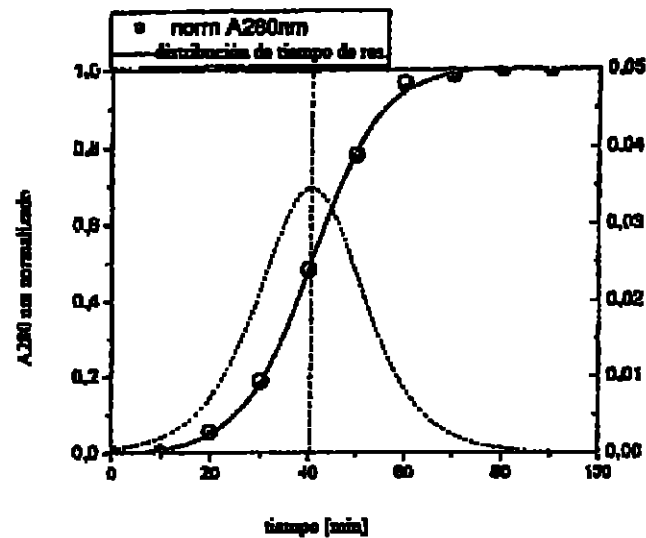


Figura 10: Ejemplo de distribución de tiempo de residencia y tiempo de residencia medio del sistema continuo integrado UF (300) como método para utilizar el dispositivo inventivo. Medido para el sistema continuo descartable con módulo de 290 cm² (62,5 cm de longitud), 120 LMH de flujo cruzado, 02 LMH de flujo de retención, 2 LMH de flujo de permeato.

11/17

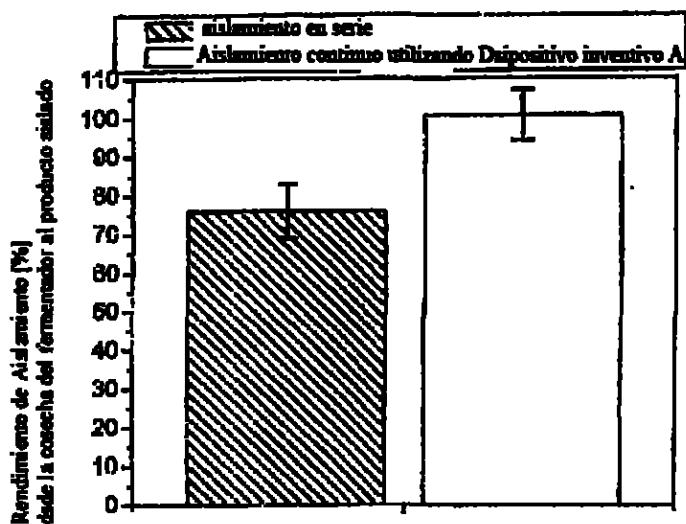


Figura 11: Ejemplo de aislamiento de rFVIII desde fermentación continua libre de proteína-plasma utilizando una incorporación del dispositivo inventivo A. Comparación del rendimiento de aislamiento procedido del método continuo inventivo en comparación con el rendimiento promedio de la aislamiento en serie, incluyendo una derivación estándar. 3 series consecutivas se utilizaron para determinar el rendimiento en serie, mientras que 3 puntos consecutivos (días) se utilizaron para el proceso continuo.

12/17

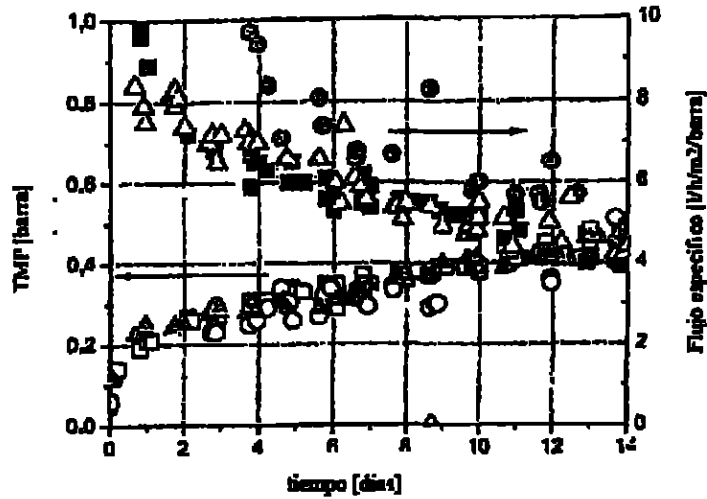


Figura 12: Ejemplos de rendimiento del dispositivo inventivo A. Presión de transmembrana y flujo específico del sistema de ultrafiltración integrado continuo (300) como una función del tiempo de proceso continuo para 3 ejemplos diferentes mostrados. Triángulos = 100 kF de membrana, Factor VIII (rFVIII)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

789

189

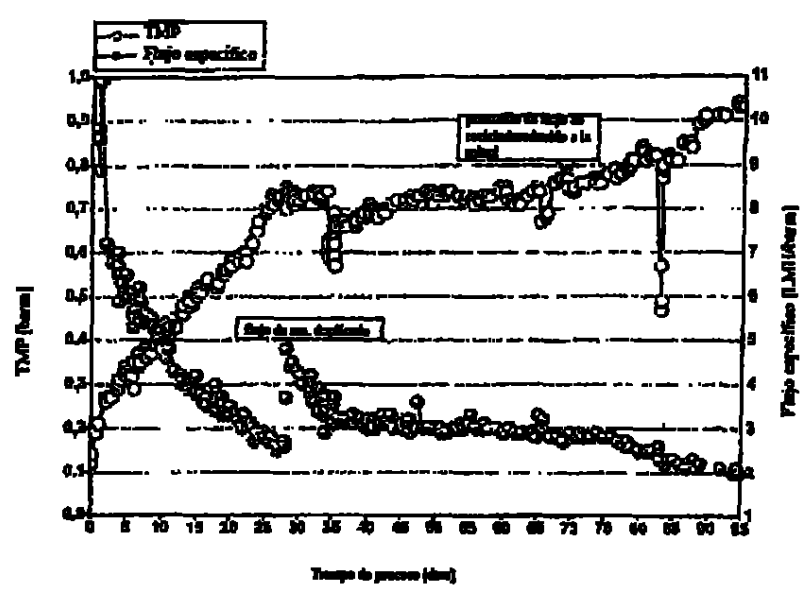


Figura 13: Ejemplo de rendimientos a largo plazo del dispositivo invasivo A directamente acoplado a formación por perfusión de productos proteicos de exposición celular 2 (GFP de proteínas fluorescentes verde y IL-2SA). Presión de transmembrana y flujo específico del sistema de ultrafiltración invasivo continuo (300) como una función del tiempo del proceso continuo mezclado. 10 MD de membrana se ha utilizado.

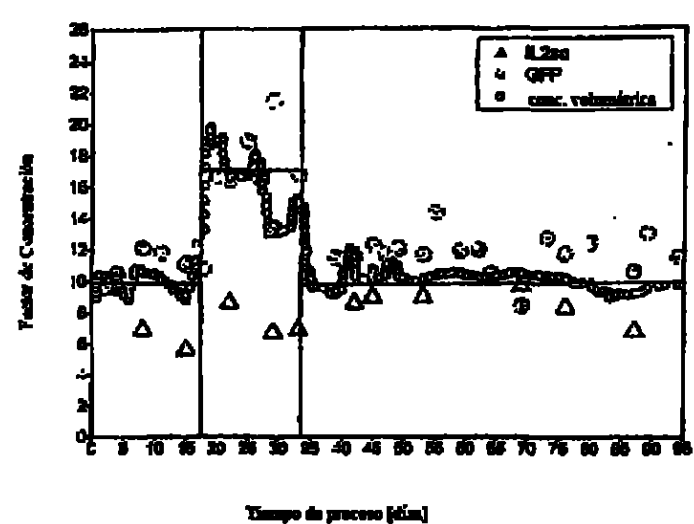


Figura 14: Ejemplo de rendimiento a largo plazo del dispositivo inventivo A directamente acoplado a formación por perfusión de productos genéticos de expresión celular 2 (GFP de proteína fluorescente verde y IL-25A). 10 MD de membrana se ha utilizado. El factor de concentración de los productos genéticos, según determinado por los ensayos específicos, y el factor de concentración volumétrico mostrado como función de tiempo de proceso continua.

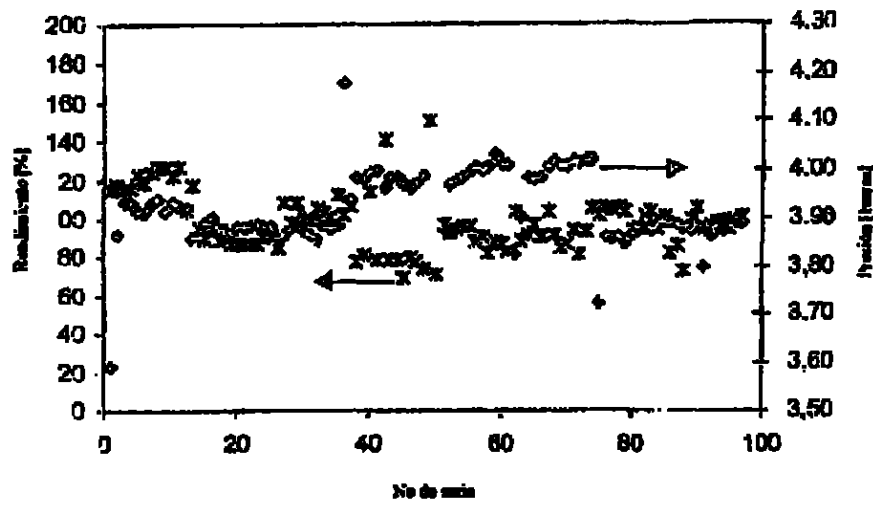


Figura 15: Ejemplo de resultados a largo plazo del dispositivo inventivo B. Rendimiento y fluctuación de presión cercana a 100 ciclos de aducción/derivación consecutivos con el absorbente convectivo (querencia objetiva: variación de fuerza FVH reconocimientos de congestión generada por ingesta gástrica; absorbente convectivo: absorbente comercial, Mustang Q, Pell Corporation).

16/17

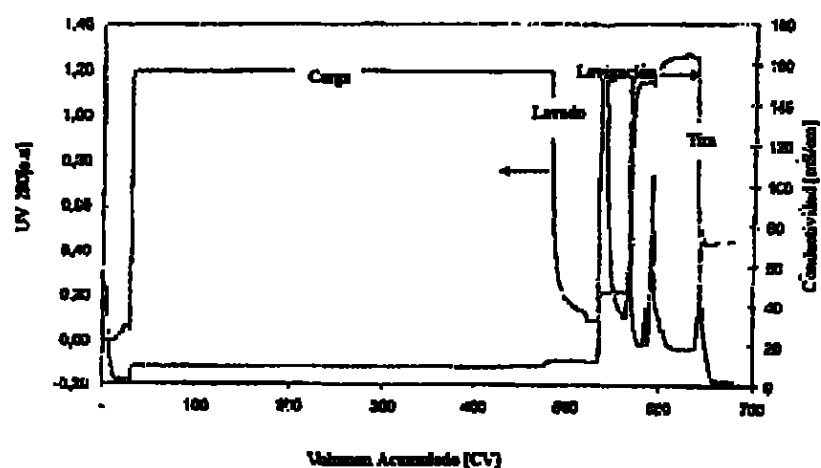
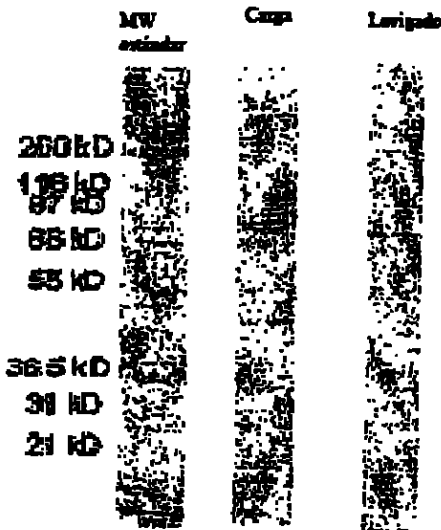


Figura 16: Ejemplo de resultados a largo plazo del dispositivo invasivo B. Perfil de conductividad y UV durante un ciclo de absorción/ desorción óptica con el adsorbente correctivo (granuloso objetivo: variante de sílice FV2II recombinados de congelación generada por ingeniería genética; adsorbente correctivo: adsorbente comercial, Mönzberg Q, Pall Corporation).

Figura 17: Ejemplo de resultados a largo plazo del dispositivo inventivo B. Gel SDS-PAGE (manchado de plata) de
Carga = Cerveza clarificada dejada continuamente al alcance de extracción de partículas (100) y tamal continuamente
cargado en el mismo adsorbente convectivo (400) y lavigación de adsorción / desorción típica mostrada. Promina
objetivo: varianza de factor FVIIII recombinante de coagulación generado por ingeniería genética; adsorbente
convectivo: adsorbente comercial, Mustang Q, Pall Corporation). El lavigado se diluyó nuevamente en la
concentración de carga antes de pasar a gel



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 Rad: 07-031230-00000-0000
 Fea: 2007-03-28 15:32:45 Dep. 2020 NUECREACIONES
 Tm. 11 PATENTEYII
 Cve: 379 PASERACIONALI
 Act 411 PRESENTACION Folio: 193



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable

Fecha 28 MAR. 2007

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
 Conmutador: 3 82 08 40
 Fax: 350 52 20
 E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

195

Bogotá,
2020

Doctor(a)
MAYA RODRIGUEZ CARLOS ORLANDO

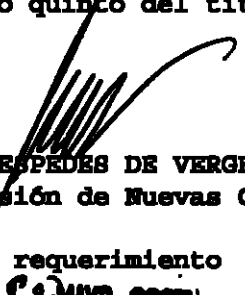
REFERENCIA	Radicación No.	7 31230
	Solicitud internacional	PCTUS2005/035364
	Fecha inicio fase nacional	30/04/2007
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	5774

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.
3. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CEPEDAZ DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 11 MAYO 2007
adpall