

Clarificación de cultivos celulares

Campo técnico

Esta descripción se refiere a un método y a un kit para la clarificación de la cosecha de cultivos celulares así como a un sistema para clarificar un cultivo celular y purificar biomoléculas de interés.

Antecedentes de la invención

La purificación de biomoléculas, tales como las proteínas que incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas de fusión, enzimas y otras proteínas recombinantes, generalmente comienza con una etapa de clarificación en la cual se eliminan las células y los residuos de manera que el sobrenadante o el filtrado restante pueda procesarse mediante métodos que de otra manera serían obstaculizados por su presencia. Su eliminación comúnmente implica métodos físicos tales como centrifugación y filtración. Este paso implica a veces el uso de materiales de filtración con capacidades de intercambio aniónico o la adición de partículas de intercambio aniónico o polímeros solubles directamente a la cosecha que contiene biomoléculas.

El documento WO 2005/073252 describe un proceso para inactivar y eliminar virus de una fracción de plasma humano que comprende inmunoglobulinas, denominada una solución de inmunoglobulina cruda. Para este propósito, la solución de inmunoglobulina cruda se trata con ácido caprílico con el fin de inactivar los virus presentes en la muestra. En el siguiente paso, las partículas virales se eliminan en un último paso por nanofiltración.

El documento WO 2015/130222 describe métodos para purificar una proteína diana que comprende poner en contacto una cosecha de cultivo celular con al menos un ácido graso que tenga de 7 a 10 átomos de carbono y alantoína en una concentración de supersaturación para formar una mezcla, y separar materiales sólidos para proporcionar una solución que comprenda la proteína diana con una carga reducida de contaminantes. La adición del ácido graso y la alantoína precipita los contaminantes y/o los residuos celulares comprendidos en la cosecha de cultivos celulares. Los precipitados se eliminan mediante sedimentación gravimétrica y/o centrifugación. El sobrenadante se filtra después utilizando un medio de filtración tal como un filtro de profundidad.

El documento WO 2014/123485 describe un método para la purificación de proteínas a partir de una cosecha de cultivos celulares. Este método comprende las etapas de tratar la cosecha de cultivos celulares con ácido caprílico e iones multivalentes orgánicos en presencia de una cantidad supersaturada de alantoína y de poner en contacto la solución con un polímero orgánico no iónico (por ejemplo PEG). Finalmente, la clarificación se obtiene pasando la solución a través de un filtro de profundidad.

Los métodos descritos en la técnica anterior presentan varios inconvenientes. En general, los métodos de la técnica anterior dan como resultado una pérdida considerable del rendimiento del producto y falta de reproducibilidad entre diferentes lotes. Dichos métodos también carecen de robustez, en particular cuando se amplían.

Los documentos WO 2015/130222 y WO 2014/123485 presentan un alto riesgo de que los precipitados o floculantes sean absorbidos y bloqueen el filtro de profundidad u otro filtro utilizado para la clarificación. Estos inconvenientes pueden llegar a ser más complejos si se asocian con las ampliaciones y transferencias de tecnología potenciales de los procesos que implementan esta tecnología. Adicionalmente, los métodos de la técnica anterior comprenden un número significativo de pasos, incrementando así la contaminación y/o el riesgo de errores humanos.

El objetivo es proporcionar un método y un kit para la clarificación de cultivos celulares que supere al menos parte de los inconvenientes antes mencionados.

Breve descripción de la invención

En un primer aspecto, un método para la clarificación de cultivos celulares comprende:

- (a) añadir uno o más compuestos a una cosecha de cultivo celular que comprenda biomoléculas de interés, dichos uno o más compuestos que faciliten la formación de floculantes de solutos y/o partículas en dicha cosecha de cultivo celular,
- (b) añadir una cantidad de tierra de diatomeas (DE) a dicha cosecha de cultivo celular;
- (c) agitar la cosecha de cultivo celular para formar una solución de cosecha,
- (d) permitir que dicha DE en dicha solución de cosecha de cultivo celular forme una capa sobre un filtro de soporte que tenga una superficie; y

(e) filtrar dicha solución de cosecha a través de dicha capa y dicho filtro de soporte.

En un segundo aspecto, se proporciona un sistema para clarificar un cultivo de células y purificar biomoléculas de interés. En particular, el sistema comprende:

- Un recipiente para recibir o producir una cosecha de cultivo celular,
- un filtro de soporte con una superficie, en donde dicha superficie es impermeable a la tierra de diatomeas (DE) y, como tal, permite la formación de una capa de DE sobre dicha superficie, en donde el filtro de soporte se encuentra presente en el primer recipiente para recibir o producir una cosecha de cultivo celular o en un recipiente de filtración fluidamente conectado a dicho primer recipiente
- un mecanismo impulsor de fluido para transferir dicha cosecha de cultivo celular a dicho recipiente de filtración y/o a través de dicha capa.

En una realización alternativa, se describe un aparato que comprende un cuerpo con una entrada para recibir medios de cultivo celular, células, compuestos de clarificación que incluyen DE y una salida; dicha salida incluye un filtro de soporte que comprende una superficie diseñada para soportar la formación de una torta de DE que filtra los compuestos de clarificación del cultivo celular y un agitador para mezclar dicho cultivo celular.

En un tercer aspecto, se describe un kit para facilitar la práctica de cualquiera de las realizaciones del método. Más en particular, se proporciona un kit para facilitar la práctica del método descrito, que comprende uno o más compuestos elegidos del grupo de ácidos grasos que tienen de 7 a 10 átomos de carbono y derivados de los mismos, ureidos y compuestos electropositivos; una cantidad de tierra de diatomeas y un folleto que comprende instrucciones para el usuario.

El método, el sistema y/o el kit presentan varias ventajas. Se puede lograr un aumento del caudal de cultivo celular durante la clarificación por filtración y un aumento del rendimiento del filtro. El número de pasos de operación se reduce, ya que la torta de filtración formada por la tierra de diatomeas no requiere pre-lavado con agua ni equilibrarse con un tampón. Además, la torta de filtración se puede lavar con solución de vaciado - en contraste con métodos en los que se permite que se forme un precipitado mediante sedimentación - mejorando así la etapa de recuperación. Adicionalmente, el método comprende un número mínimo de pasos para lograr la

clarificación del cultivo celular. Específicamente, se pueden eliminar las etapas de pulido y las etapas de acondicionamiento de tampón asociadas. Esto reduce considerablemente el tiempo de procesamiento, la complejidad, la carga de trabajo, el riesgo de contaminación y el costo del proceso de purificación de biomoléculas diana.

Descripción de las figuras

Las figuras 1A a 1C muestran vistas generales esquemáticas de posibles formas de realización de sistemas de divulgación para clarificación de cultivos celulares.

Las figuras 2A y 2B muestran vistas esquemáticas de sistemas ilustrativos para clarificar un cultivo celular y purificar biomoléculas de interés de acuerdo con las realizaciones de la presente descripción.

Descripción detallada de la invención

Primero se describe un método, un kit para clarificación de cultivo celular y un sistema para clarificar una cosecha de cultivo celular y purificar biomoléculas de interés. El cultivo celular comprende al menos una biomolécula de interés. Las "Biomoléculas" incluyen proteínas tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas de fusión, enzimas, proteínas recombinantes, péptidos, polipéptidos u otras biomoléculas expresadas por las células.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos usados en esta descripción, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado que normalmente entiende un experto en la técnica a la cual pertenece esta descripción. Como medio de orientación adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor las enseñanzas de la presente descripción.

"Un", "uno/una", y "el" tal como se usan en este contexto se refieren tanto al singular como al plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. A modo de ejemplo, "un compartimento" se refiere a uno o más de un compartimento.

"Aproximadamente", tal como se utiliza en la presente memoria refiriéndose a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, abarca variaciones de +/-20% o menos, preferiblemente +/-10% o menos, más preferiblemente +/-5% o menos, aún más preferiblemente +/-1% o menos, y aún de manera más preferible +/-0,1% o menos de y a partir del valor especificado, en la medida en la que tales variaciones sean apropiadas para realizarse en la descripción

dada a conocer. Sin embargo, se debe entender que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" en sí se describe también específicamente.

"Comprender", "que comprende/a" y "comprende" y "compuesto de", según se utiliza en la presente, son sinónimos de "incluir", "incluyendo", "incluye" o "contener", "que contiene", "contiene" y son términos inclusivos o abiertos que especifican la presencia de lo que sigue, por ejemplo, componente, y no excluyen ni exceptúan la presencia de componentes, características, elementos, partes, pasos adicionales y no enunciados, conocidos en la técnica o descritos en la misma.

La cita de rangos numéricos por puntos finales incluye todos los números y las fracciones incluidas dentro de ese rango, así como los puntos finales citados.

La expresión "% en peso" (porcentaje en peso), aquí y a lo largo de la descripción, a menos que se defina de otra manera, se refiere al peso relativo del componente respectivo con base en el peso total de la formulación. La expresión "1% w/w" se refiere a lo que se puede entender como 1 g del componente respectivo por 100 g de la formulación, la expresión "1% p/v" se refiere a lo que se puede entender como 1 g del componente respectivo por 100 ml de la formulación, la expresión "1% v/v" se refiere a lo que se puede entender como 1 ml de componente respectivo por 100 ml de la formulación.

El término "particulados" se refiere a partículas sólidas suspendidas en un líquido.

El término "floculación" se refiere a la agregación, precipitación y/o aglomeración de partículas insolubles provocadas por la adición de un agente floculante adecuado a una suspensión. Al incrementar el tamaño de partícula de los componentes insolubles presentes en la suspensión, se mejora la eficiencia de las separaciones de sólido/líquido, tal como por filtración o centrifugación. La floculación de un cultivo celular conduce a la formación de "flóculos" que comprenden impurezas de células huésped tales como material celular que incluye células y residuos celulares o proteínas de células huésped, ADN u otros componentes presentes en el mismo.

Los términos "cosecha de cultivo celular", "cosecha de cultivo" y "cosecha" se utilizan en la presente como sinónimos y se refieren al cultivo celular no clarificado obtenido al final de cultivar células en un biorreactor. A las células cultivadas o las células desarrolladas también se les denomina células huésped.

El término " biorreactor " como se utiliza en la presente se refiere a cualquier dispositivo o sistema que soporte un ambiente biológicamente activo, por ejemplo para el cultivo de células u organismos para la producción de un producto biológico. Esto incluiría pilas de celdas, botellas de rodillos, agitadores, matraces, biorreactores de suspensión de tanque agitado, biorreactores de perfusión de lecho fijo de alta densidad celular, etc.

Los términos "molécula de interés" o "biomolécula de interés" o "biomolécula diana" o "molécula diana de interés" o "biomolécula diana de interés" o "biomolécula" se utilizan aquí como sinónimos y se refieren a una molécula orgánica en un organismo vivo que tiene características típicas de moléculas encontradas en o secretadas por organismos vivos incluyendo células individuales y que pueden estar presentes de manera natural o pueden ser artificiales (no encontrados en la naturaleza ni idénticos a una molécula encontrada en la naturaleza). Las biomoléculas diana ejemplares incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, aminoácidos, glicoproteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos nucleósidos, oligonucleótidos, azúcares, oligosacáridos, lípidos, hormonas, proteoglicanos, carbohidratos, polipéptidos, polinucleótidos, polisacáridos.

Los términos "estructura de tierra de diatomeas", "torta de filtro de tierra de diatomeas", "torta de filtración de tierra de diatomeas" y "torta de tierra de diatomeas" se utilizan aquí como sinónimos y se refieren a la estructura formada por la tierra de diatomeas durante el proceso de filtración. La tierra de diatomeas utilizada en el método o sistema de acuerdo con la descripción puede ser de varios "grados", en donde el grado proporciona una indicación del tamaño de los poros presentes en la tierra de diatomeas. El grado de tierra de diatomeas utilizado en un método o sistema de acuerdo con la descripción depende de la morfología, particularmente el tamaño y la forma, de las células a partir de las cuales se va a obtener un cultivo celular clarificado. Por ejemplo, para cultivos de células CHO, se puede usar el grado Celpure 300® o el grado Celpure 100®. Para cultivos de células CHO desarrolladas en un ambiente adherente tal como con un biorreactor de lecho fijo de alta densidad celular, se puede usar el grado Cellpure 100® o grado Celpure 65®. Cuanto más pequeños son los flóculos, más fino es el grado de DE que se necesita, en general.

El término "filtración" o "separación" se refiere a la eliminación de la fase acuosa, que contiene las biomoléculas solubles de interés, a partir de las partículas insolubles, por ejemplo después de la floculación de la cosecha de cultivos celulares.

Tal como se utiliza en la presente, el término "ácido graso libre" se refiere a un ácido graso no modificado, es decir, un ácido graso no convertido en una sal, una amida, un éster, etc. Tal como se utiliza en la presente, el término "derivado de ácido graso" se refiere a una sal del ácido graso libre o un ácido graso cuyo grupo de ácido carboxílico se convierte de manera reversible en otro grupo para formar amidas, ésteres, glicéridos, azúcares.

El término "ureido" se refiere a cualquier clase de compuesto orgánico derivado de urea mediante la sustitución de uno o más de sus átomos de hidrógeno por grupos orgánicos, incluyendo compuestos derivados de la acilación de urea y compuestos de diureídos que contienen dos moléculas de urea, o radicales de las mismas. Los ureidos pueden tener una estructura cíclica o acíclica e incluyen pero no se limitan a alantoína y ácido alantoico.

El término "compuesto electropositivo" debe entenderse como moléculas que tienen una carga neta positiva y son capaces de unirse a, o formar complejos, con moléculas cargadas negativamente.

El término "purificación" tal como se utiliza en la presente se refiere a la reducción sustancial de la concentración de una o más impurezas o contaminantes diana con relación a la concentración de las biomoléculas de interés.

En un primer aspecto, un método para clarificación de cultivos celulares comprende:

- (a) añadir uno o más compuestos a una cosecha de cultivo celular que comprende biomoléculas de interés, dichos uno o más compuestos que facilitan la formación de floculantes de solutos y/o partículas en dicha cosecha de cultivo celular,
- (b) añadir una cantidad de tierra de diatomeas (DE) a dicha cosecha de cultivo celular;
- (c) agitar la cosecha de cultivo celular para formar una solución de cosecha,
- (d) Permitir que dicho DE en dicha solución de cosecha de cultivo celular forme una capa sobre un filtro de soporte que tenga una superficie; y
- (e) filtrar dicha solución de cosecha a través de dicha capa y dicho filtro de soporte.

Este método conduce a la eliminación rápida y fácil de impurezas derivadas de células huésped, incluyendo las propias células, residuos celulares y otros materiales no deseados permitiendo un procesamiento adicional eficiente del cultivo celular que de otra manera sería amenazado por las impurezas derivadas de células huésped. Por lo tanto, la descripción proporciona un método robusto y de alto rendimiento para clarificación de cultivos celulares. De manera concomitante, el método de la descripción reduce el número de pasos de post-clarificación necesarios para obtener la molécula de interés, reduciendo así la complejidad y el tiempo para el procesamiento del DSP e incrementando el rendimiento debido a la eliminación de estos pasos de post-clarificación adicionales.

La formación de flóculos en el cultivo celular se consigue en el paso (a) mediante la adición de compuestos que estimulan la precipitación de impurezas y/o la agregación o aglomeración de impurezas, precipitados o partículas presentes en el cultivo celular. Específicamente, las fracciones precipitadas contienen impurezas de células huésped, por ejemplo, células huésped, proteínas de células huésped y ADN de células huésped, minimizando de esta manera el contenido de impurezas de células huésped en la fracción no precipitada de la primera solución.

La floculación de las impurezas de las células huésped se logra debido a la capacidad de los compuestos agregados para ejercer interacciones hidrófobas, interacciones iónicas y/o enlaces de hidrógeno con las impurezas relacionadas con las células huésped presentes en la cosecha de cultivos celulares u otros mecanismos de interacción.

La adición de los compuestos cambia las propiedades físicas de la suspensión que comprende las células huésped, los restos celulares, los compuestos añadidos y/o las diversas impurezas y las biomoléculas diana. De hecho, el tamaño promedio de las partículas en la cosecha de cultivos celulares aumenta.

La adición de una cantidad de DE a la cosecha, suspensión o solución de cultivo celular implementa un mecanismo de filtración de las cosechas tratadas/floculadas sin alterar la capacidad de los compuestos añadidos para eliminar impurezas relacionadas con las células huésped. En una realización, la cantidad de DE puede basarse en la cantidad de sólidos en la cosecha, incluyendo el cálculo del peso de las células húmedas como se describe más adelante. En una realización, se añade el DE luego de la adición de los compuestos, tal como de 30 a 45 minutos después. En otra realización, se añade una

cantidad de DE antes de la adición de los compuestos. En una realización alternativa, una cantidad de hasta 100% de la DE se añade simultáneamente con los compuestos.

La agitación de la cosecha de cultivos celulares puede ser continua o discontinua. Se puede mantener durante 5 a 60 minutos, durante 8 a 40 minutos, durante 10 a 30 minutos, durante 15 a 20 minutos. La agitación se mantiene a cualquier frecuencia que sea suficiente para mantener la solución mezclada homogéneamente, preferiblemente la frecuencia de agitación es de 60 a 240 rpm. La agitación se puede lograr por varios medios conocidos en la técnica tales como el mezclado de la solución por un mezclador presente en el recipiente, o agitando o balanceando el recipiente.

Posteriormente, se filtra la solución, eliminando así los flóculos y dando como resultado un cultivo celular clarificado. Para conseguir tal filtración, un filtro de soporte que tenga una superficie puede estar presente en el biorreactor, en donde el filtro de soporte tiene una superficie que es impermeable a la tierra de diatomeas. En una realización alternativa, el paso d) comprende el paso de transferir dicha solución de cosecha agitada a un recipiente de filtración que comprende un filtro de soporte que tiene una superficie y que permite formar una capa de DE sobre dicha superficie. Opcionalmente, se permite un diferencial de presión para formar la capa de DE sobre la superficie. Para permitir la formación de la capa de DE, la agitación se detiene o se pausa temporalmente, especialmente en el diseño en el que el filtro de soporte está integrado en el primer recipiente. No se necesita un cese de la agitación cuando se produce la adición de compuestos y DE en un recipiente separado del recipiente que comprende la superficie. En este caso, se desea una agitación constante para asegurar la homogeneidad de la solución.

La DE se acumula en un lado de la superficie y gradualmente forma una estructura denominada una "torta de DE" (o "capa de DE"), estructura que comprende una pluralidad de canales o trayectorias. Después de un período de tiempo, la estructura de la torta de DE formada sirve como medio de filtración (es decir, un filtro). La gran materia, tales como células, residuos celulares y otros compuestos no-diana grandes de la solución obtenida, son retenidos por la estructura de la torta de DE, mientras que las biomoléculas diana, que tienen un tamaño más pequeño, fluyen a través de los canales de la estructura de la torta de DE. Para facilitar tal flujo, se utiliza una bomba u otro accesorio de distribución de presión u otro mecanismo impulsor de fluido como se describe adicionalmente en las realizaciones a continuación. De este modo se obtiene un cultivo celular clarificado que comprende las biomoléculas de interés.

El tamaño o el diámetro de los canales formados por la estructura de la torta de DE se define por el tamaño de partícula de la DE añadida a la primera solución. El tamaño de la partícula DE puede seleccionarse de acuerdo con las propiedades del cultivo celular y/o las propiedades de las células usadas para expresar la molécula de interés (esto incluye el tipo de células (por ejemplo, células CHO) y la densidad celular de la cosecha a ser clarificada). La DE puede ser de diversos grados que se encuentran disponibles comercialmente en el mercado. Por ejemplo, para cultivos de células CHO, el grado Celpure 300® o el grado Celpure 1000® se puede usar en biorreactores de suspensión tradicionales. Se deben usar grados más finos de DE para biorreactores de alta densidad celular con un lecho fijo sobre el que se adhieren las células.

El uso de tierra de diatomeas para facilitar la filtración supera las limitaciones impuestas por los cambios físicos del cultivo celular después de la floculación, que tienden a hacer que la clarificación de rutina sea compleja. Por ejemplo, en caso de filtración en profundidad, se necesita una superficie muy significativa de filtros de profundidad para clarificar la primera solución que comprende los precipitados formados. Para evitar tener un bajo rendimiento, los precipitados de la solución floculada se dejan sedimentar por gravedad, a lo que sigue una transferencia del sobrenadante obtenido al filtro de profundidad como se describe en el documento WO 2015/130222. Este enfoque carece de robustez, requiere una adaptación significativa de los colectores y presenta un alto riesgo de que los precipitados o los floculantes sean succionados en el sistema y bloqueen el filtro de profundidad. Utilizando el método de clarificación del documento WO 2015/130222, la fracción precipitada contiene aún algo de material diana valioso que no se recupera por filtración de profundidad adicional. Además, dicho método requiere operaciones adicionales para conseguir la calidad deseada de la cosecha de cultivos celulares clarificados, es decir, un período de retención para permitir que la materia particulada o los floculantes se asienten.

La adición de DE a la solución no altera el rendimiento de los compuestos de precipitación del paso (a) ni la reducción de las impurezas celulares. Al mismo tiempo, ya no se requiere que los precipitantes se sedimenten por gravedad. La solución obtenida de preferencia se encuentra constantemente bajo agitación. La estructura de la torta de DE se forma sobre la superficie y sirve como filtro, tal como se describe anteriormente. Esto permite lograr ventajas operacionales significativas que incluyen tiempo de procesamiento más corto, menos etapas de proceso, menos materiales de

proceso, menos equipo y soluciones, sin comprometer la calidad de la cosecha clarificada.

El método, en particular el uso de DE permite:

- aumentar el caudal durante la filtración: caudal de 1.000-2000 LMH (litros por metro cuadrado por hora) utilizando tierra de diatomeas frente a 100 a 150 LMH en filtración utilizando métodos en los que se precipitan impurezas o residuos celulares (tal como cuando se usan filtros de profundidad disponibles comercialmente),
- aumentar el rendimiento del filtro: la estructura de la torta de DE permite procesar al menos 400L de cultivo celular que comprende precipitado por 1 m² de torta de filtración, mientras que los filtros del estado de la técnica pueden procesar como máximo 300-350 L/m² de cultivo celular que comprende precipitado formado según el procedimiento descrito anteriormente,
- conseguir el valor de turbidez del depósito de filtrado por debajo de 5 NTU y por lo tanto eliminar la necesidad de cualquier filtración de profundidad adicional en el proceso. El filtrado puede introducirse directamente sobre el filtro de calidad esterilizante y procesarse adicionalmente,
- reducir los pasos del método requeridos para lograr la clarificación del cultivo celular. Por ejemplo, no se requieren subpasos de enjuague con agua ni equilibrar con tampón isotónico para una torta de filtración formada a partir de DE conforme a la presente descripción, no obstante este es el caso de los métodos de la técnica anterior que implementan filtros de profundidad estándar comercialmente disponibles. Esto conduce a una considerable reducción de costos y tiempo, requerida para conseguir la calidad deseable de cosecha de cultivos celulares clarificados.

En una realización adicional, los compuestos que permiten la formación de flóculos se eligen del grupo de ácidos grasos que tienen de 7 a 10 átomos de carbono y derivados de los mismos, ureidos y compuestos electropositivos. Los diferentes compuestos del paso (a) pueden mezclarse antes de su adición al cultivo celular. Los compuestos del paso (a) también se pueden añadir por separado al cultivo celular. En este caso, los compuestos se pueden introducir en cualquier orden o secuencia. En una realización adicional, los pasos (a) y (b) se implementan simultáneamente. Esto resulta ventajoso ya que reduce el número de pasos necesarios para obtener un cultivo celular clarificado.

Los inventores han encontrado que los compuestos del grupo mencionado anteriormente son especialmente adecuados para inducir la precipitación y floculación de impurezas asociadas con el cultivo de células huésped en el paso (a) del método de acuerdo con la descripción. Se cree que los ácidos grasos que tienen de 7 a 10 átomos de carbono ejercen interacciones hidrófobas con impurezas derivadas de células huésped hidrófobas, provocando su aglomeración. Los derivados de ácidos grasos que tienen de 7 a 10 átomos de carbono son igualmente muy adecuados como ácidos grasos no modificados en el paso (a) de la descripción. Estos derivados incluyen, pero no se limitan a, sales de ácido graso incluyendo sales de sodio y sales de potasio de los respectivos ácidos grasos libres.

Los ureidos son compuestos orgánicos derivados de urea al reemplazar uno o más de sus átomos de hidrógeno por grupos orgánicos que incluyen compuestos derivados de la acilación de urea y compuestos de diureidos que contienen dos moléculas de urea, o radicales de las mismas. Los ureidos pueden tener una estructura cíclica o acíclica e incluyen, pero no se limitan a, alantoína y ácido alantoico. Se encontró que los ureidos son particularmente muy adecuados como agentes aglutinantes en el paso (a) del método de la presente descripción. Sin el deseo de limitarse a la teoría, se cree que los ureidos funcionan como agentes aglutinantes mediante la interacción con impurezas en solución, por ejemplo a través de enlaces de hidrógeno.

Los compuestos electropositivos son muy adecuados para uso como agentes floculantes en el paso (a) de un método de acuerdo con una realización. Se cree que los compuestos electropositivos se unen a componentes cargados negativamente derivados de células huésped tales como, pero sin limitarse a, ácidos nucleicos que incluyen ADN y ARN de células huésped.

Los inventores han encontrado que los compuestos seleccionados de una de las tres clases de compuestos anteriormente mencionadas, cuando se aplican como agentes floculantes en el paso (a) de un método de acuerdo con la presente descripción, dan como resultado un aclaramiento excepcional de los cultivos celulares que comprenden una biomolécula de interés.

Preferiblemente, en el paso (a) se añaden uno o más ácidos grasos que tienen de 7 a 10 átomos de carbono o derivados de los mismos, alantoína y uno o más compuestos electropositivos. Los inventores descubrieron que esta combinación se destacaba cuando se aplicaba en el paso (a) del método descrito.

En una realización adicional del método para la clarificación de cultivos celulares, las células que comprenden al menos una biomolécula de interés o biomolécula diana se cultivan en al menos un biorreactor; se determina el peso celular húmedo del cultivo celular, una composición que comprende al menos un ácido graso que tenga de 7 a 10 átomos de carbono, alantoína y por lo menos un compuesto electropositivo se agregan al cultivo celular; se adiciona tierra de diatomeas y la solución obtenida se filtra en al menos un recipiente de filtración.

En una realización, los compuestos añadidos en el paso (a) se incuban con la cosecha de cultivos celulares durante 5 a 360 minutos, preferiblemente de 15 a 240 minutos, aún más preferiblemente de 60 a 120 minutos, siendo lo más preferiblemente de 30 a 60 minutos, o durante un intervalo intermedio. En una realización, después de la adición de los compuestos, la cosecha de cultivo celular se somete a agitación continua a 60 a 120 rpm. Dicho cultivo celular se mantiene preferentemente a temperatura ambiente. El período de incubación permite que tenga lugar la floculación, mientras que la agitación continua impide la deposición de los compuestos o los solutos/partículas suspendidas en el cultivo celular, permitiendo así el contacto óptimo entre las impurezas derivadas de células huésped y los compuestos añadidos al cultivo celular en el paso (a).

La cosecha de cultivo celular no clarificada que comprende al menos una biomolécula de interés puede obtenerse cultivando células en al menos un biorreactor. El biorreactor puede ser cualquier tipo de biorreactor conocido por el experto en la técnica, tal como un biorreactor de tanque de agitación, biorreactor de onda, biorreactor cilíndrico, biorreactor de bolsa, biorreactor de lecho móvil, biorreactor de lecho empacado, biorreactor fibroso, biorreactor de membrana, biorreactor discontinuo, biorreactor de perfusión de alta densidad celular con lecho fijo o biorreactor continuo. El biorreactor puede tener cualquier forma y puede estar hecho de cualquier material, por ejemplo, acero inoxidable, vidrio o plástico. Cuando el biorreactor en el que se lleva a cabo la producción de cultivos celulares es un biorreactor de alta densidad con un lecho fijo, los compuestos del paso (a) y la DE del paso (b) se añaden a un recipiente intermedio separado ya que la DE no puede penetrar el volumen de lecho fijo y formar una torta de DE adecuada. Sin embargo, en un biorreactor de suspensión tradicional, los dos pasos pueden llevarse a cabo en el biorreactor mismo. En consecuencia, en una realización adicional, el cultivo celular reside en un biorreactor en el que tiene lugar la producción de cultivos celulares y los compuestos del paso (a) se añaden directamente al biorreactor. La adición se lleva a

cabo después de alcanzar la etapa deseada de cultivo celular tal como una densidad celular predeterminada o luego de un tiempo de cultivo celular predeterminado, obteniendo de este modo una cosecha de cultivo celular. Esto resulta ventajoso ya que reduce considerablemente la carga de trabajo y no requiere tanques, líneas ni ajustes intermedios.

En una realización, las células se desarrollan en la presencia de un medio de cultivo adaptado en el biorreactor. El medio de cultivo adaptado se refiere a la composición del medio que se requiere para el crecimiento de las células. Dichas composiciones son conocidas por el experto en la técnica y generalmente comprenden sales, vitaminas, aminoácidos, azúcares o cualquier combinación de los mismos. El medio de cultivo puede precalentarse a una temperatura de 20 a 40°C, preferiblemente de 25 a 38°C, más preferiblemente de 30 a 37°C. En una realización adicional, el mencionado medio de cultivo se pre-calienta a aproximadamente 37°C.

En una realización, la tierra de diatomeas se añade directamente al biorreactor. Esto es ventajoso ya que reduce considerablemente la carga de trabajo y no requiere tanques, líneas ni ajustes intermedios.

Alternativamente, la cosecha de cultivo celular que comprende al menos una biomolécula de interés puede retirarse del biorreactor antes del paso (a). En consecuencia, en otra realización adicional, el cultivo celular reside en un recipiente intermedio corriente abajo de un biorreactor que produce dicho cultivo celular y los compuestos del paso (a) se añaden a este recipiente intermedio. Los inventores han encontrado que el uso de un recipiente intermedio para llevar a cabo el paso (a) del método puede ser ventajoso cuando la formación de floculantes podría, por ejemplo, dañar el biorreactor o cuando no es posible efectuar la agitación adecuada del cultivo celular con los compuestos añadidos en el biorreactor en el que se ha llevado a cabo la producción de cultivos celulares.

En una realización, los compuestos del paso (a) comprenden de 0,1% a 1,0% de ácido graso v/v. En una realización adicional, los compuestos del paso (a) comprenden de 0,6% a 3% p/v de alantoína, dependiendo del tipo de cultivo celular utilizado, pero deben alcanzar el nivel de sobresaturación para un rendimiento óptimo. En otra realización adicional, los compuestos del paso (a) comprenden 0,01% a 1% p/v de compuesto electropositivo. Los inventores han encontrado que cuando estos compuestos se incluyen en el paso (a) en las cantidades descritas, permiten la formación efectiva de flóculos en el cultivo celular. Más preferiblemente, los

compuestos del paso (a) comprenden de 0,3% a 0,6% p/v de ácido graso, 1,0% a 2,0% p/v de alantoína y/o 0,05% a 0,1% p/v de compuesto electropositivo. Más preferiblemente, los compuestos del paso (a) comprenden de 0,4% a 0,5% de ácido graso v/v, 1,2% a 1,8% p/v de alantoína y/o 0,06% a 0,08% p/v de compuesto electropositivo. Los compuestos pueden estar en forma líquida o sólida (tal como una mezcla de polvos).

En una realización, se determina el peso celular húmedo del cultivo celular (WCW) y la cantidad de DE agregada es de 20 a 60% del peso celular húmedo de dicho cultivo celular (WCW), preferiblemente de 25 a 55%, más preferiblemente de 30 a 50%, aún más preferiblemente de 35 a 45%, lo más preferiblemente alrededor de 40% del WCW del cultivo celular. El WCW se determina mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica. Para ciertos biorreactores, la optimización de la cantidad y el grado de DE es necesariamente empírica. Cuando la cantidad de DE excede el 60% del WCW, no se observa ninguna mejora adicional en la captura y filtración de impurezas de células huésped por la estructura de la torta de DE durante la filtración, mientras que el costo debido a la mayor cantidad de DE se incrementa, así como el tiempo de filtración debido al espesor incrementado de la torta de DE. De esta manera, al usar una cantidad de DE que exceda el 60% del WCW, se podría reducir la eficiencia del proceso de clarificación del cultivo celular.

Preferiblemente, el WCW se determina como sigue: las muestras de cultivo celular se retiran del biorreactor después de alcanzar la etapa deseada del cultivo celular y se recogen al menos 3 muestras. El volumen de cada muestra puede variar de 15 ml a 50 ml o cualquier otro volumen representativo, dependiendo de la escala del biorreactor. Las muestras se centrifugan a 4000 a 5000 g durante 5 a 10 minutos para sedimentar las células. El sobrenadante obtenido se desecha y el WCW se calcula con base en la diferencia entre el peso de los tubos centrífugos vacíos y el peso de los tubos centrífugos que contienen células sedimentadas. Se calcula el promedio de las tres mediciones y se registra como WCW en gramos por litro.

La fórmula estructural general de ácidos grasos libres es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, en la que n es un número entero de 4 a 12 inclusive, preferiblemente de 5 a 8 inclusive. El ácido graso puede ser ácido enantóico (ácido heptanoico), ácido caprílico (ácido octanoico), ácido pelargónico (ácido nonanoico), ácido cáprico (ácido decanoico) o cualquier combinación de los mismos. El ácido graso se puede añadir en forma de un derivado de ácido graso, por ejemplo, una sal de ácido graso, tal como una sal sódica, por

ejemplo caprilato sódico. La porción grasa del ácido graso o derivado de ácido graso puede consistir de una cadena lineal "recta" de átomos de carbono. En algunas realizaciones, la porción grasa del ácido graso o derivado de ácido graso puede consistir de una cadena ramificada, tal como ácido 2-etilhexanoico, que contiene una cadena de 2 carbonos en la posición del número 2 de la cadena primaria de 6 carbonos, produciendo un total de 8 átomos de carbono. El ácido graso o derivado de ácido graso puede incluir un doble enlace en cualquier posición en la cadena de carbono. La cadena de carbono de ácido graso o derivado de ácido graso puede contener 6 o 7 u 8 o 9 átomos de carbono. El ácido graso libre también podría ser ácido nonenoico con un doble enlace terminal.

En una realización, el compuesto electropositivo es cualquier partícula cargada electropositiva tal como polisacárido electropositivo, polímero electropositivo, quitosano, derivados de quitosano, polímeros sintéticos tales como cloruro de polidialildimetilamonio (pDADMAC o poliDDA), poli(alilamina) benzilada y polietilenimina, partículas comercialmente disponibles como TREN ((BioWorks, WorkBeads TREN, alto) o tensioactivos catiónicos como bromuro de hexadeciltrimetilamonio (también conocido como CTAB) o cualquier combinación de los mismos. Sin el deseo de limitarse a la teoría, se cree que los polímeros electropositivos actúan como agentes de floculación debido a que pueden unir simultáneamente varios contaminantes cargados negativamente, tales como ADN y ARN de células huésped, provocando la formación de un flóculo. Se encontró que los compuestos electropositivos mencionados anteriormente tienen un rendimiento extremadamente bueno (formación de flóculos y tamaño de flóculos) cuando se combinan con filtración usando DE conforme al método de la descripción.

En una realización, el compuesto electropositivo puede ser quitina desacetilada (quitosano, también denominado poli (d-glucosamina)) con un grado de desacetilación de al menos el 75% y un peso molecular de 30 kDa a 1000 kDa, preferiblemente de 300 kDa a 400 kDa, más preferiblemente de 325 kDa a 375 kDa o cualquier valor intermedio. El quitosano es muy adecuado para la floculación de cultivos celulares de mamíferos ya que se produce a partir de fuentes no-mamíferas (típicamente corazas de artrópodos) y también está disponible en una forma altamente purificada que es baja en metales pesados, compuestos orgánicos volátiles y materiales microbianos. La desacetilación imparte solubilidad limitada en la quitina insoluble y los grupos amino en el polímero dan como resultado un material policatiónico a pH ácido y neutro que puede interactuar con polianiones, tales como ADN y residuos de cultivos celulares

(típicamente cargados negativamente). Opcionalmente, la composición comprende además otros compuestos electropositivos adicionales al quitosano o en lugar de quitosano.

En una realización, después de la adición de los compuestos en el paso (a), el pH de la solución se ajusta de tal manera que está comprendido entre 4 y 7 preferiblemente entre 5,0 y 6,0, más preferiblemente entre 5,1 y 5,4, lo más preferiblemente entre 5,25 y 5,35, o un valor intermedio. El ajuste del pH mejora el aclaramiento de las impurezas de células huésped presentes en el cultivo celular, tales como proteínas de células huésped y ADN de células huésped, durante la etapa de clarificación. Además, el pH ácido cambia la distribución de tamaño medio de las partículas contenidas en la cosecha de cultivos celulares no clarificados mejorando así el rendimiento del paso (c). Otra ventaja importante del ajuste del pH después de la adición de los compuestos del paso (a) es asegurar la consistencia y reproducibilidad de la clarificación de la operación de lote a lote, durante escalamientos y transferencias.

El ajuste de la conductividad también puede impactar la recuperación de proteínas diana de manera que también es preferible acoplar en actividad de optimización similar para esta característica.

En un segundo aspecto, un sistema para clarificar un cultivo celular y purificar biomoléculas de interés comprende:

- un primer recipiente para recibir o producir una cosecha de cultivo celular,
- un recipiente de filtración conectado de manera fluida a dicho recipiente y que tiene un filtro de soporte con una superficie, en el que dicha superficie es impermeable a la tierra de diatomeas (DE) y, como tal, permite la formación de una capa de DE sobre dicha superficie,
- un mecanismo de conducción de fluidos para transferir dicha cosecha de cultivo celular a dicho recipiente de filtración y/o a través de dicha capa.

El término impermeable se utiliza para significar que la superficie es impermeable a la gran mayoría (casi 100%) de partículas de DE. El término "mecanismo de conducción de fluidos" se debe entender como un dispositivo mecánico que utiliza succión o presión para elevar o desplazar fluidos (incluyendo líquidos o gases). Un ejemplo de dicho mecanismo es una bomba.

El recipiente se conecta de manera fluida a un recipiente de filtración. Cada uno de los recipientes y el recipiente de filtración comprenden al menos una entrada y una salida.

Preferiblemente, la salida del recipiente se conecta de manera fluida a la entrada del recipiente de filtración. El cultivo celular puede introducirse en o pasarse a través del recipiente de filtración utilizando al menos un mecanismo de conducción de fluidos tal como una bomba. Preferiblemente, la velocidad de flujo y/o la presión en la entrada del recipiente de filtración se mide utilizando medios de medición adaptados dispuestos en dicha entrada. El recipiente de filtración y/o los medios de medición pueden ser cualesquiera medios conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, el recipiente de filtración puede ser una carcasa hecha de material polimérico que se ensambla alrededor de una superficie que es impermeable a las partículas de tierra de diatomeas. Dicha carcasa y membrana de material polimérico define un área de superficie de filtración de al menos 20 a 30 cm² por cada 1L de la cosecha de cultivos de células floculadas.

El recipiente de filtración puede tener cualquier forma. Es preferentemente cilíndrico con un diámetro de aproximadamente 5,5 cm y una altura de aproximadamente 4,5 cm que es suficiente para procesar hasta 1 litro de cultivo celular. Preferiblemente, el recipiente de filtración comprende una entrada y una salida teniendo cada una por lo menos un puerto para conectar dicha entrada y/o salida a otras líneas o recipientes y por lo menos un puerto de ventilación para eliminar el aire durante el llenado del recipiente de filtración. Una entrada y/o salida del recipiente de filtración podría estar equipada con sensores de presión u otros sensores o elementos de control, si fuera necesario.

En una realización alternativa, se describe un aparato que comprende un cuerpo con una entrada para recibir medios de cultivo celular, células, compuestos de clarificación que incluyen DE y una salida; dicha salida incluye un filtro de soporte que comprende una superficie diseñada para soportar la formación de una torta de DE que filtra los compuestos de clarificación del cultivo celular y un agitador para mezclar dicho cultivo celular. En este diseño integrado, la superficie está presente en la salida de dicho primer cuerpo, que puede ser un biorreactor como se describió anteriormente. En este diseño integrado, la superficie está presente preferiblemente en el fondo del primer recipiente en donde residiría el drenaje o la salida, pero podría colocarse en cualquier lugar, de tal manera que la dirección del flujo de fluido sería a través de la superficie y de la capa de DE. Después de terminar el proceso de cultivo celular, se añaden los compuestos y el DE y se agita la cosecha de cultivo celular para conseguir una solución (homogénea). La agitación puede ocurrir a través de cualquier medio conocido en la técnica, tal como mediante un mezclador presente en el recipiente o agitando o

balanceando el recipiente. Posteriormente, se permite que la torta de DE se forme en la superficie del filtro de soporte pausando la agitación y permitiendo (por ejemplo, por gravedad) o facilitando (por ejemplo, por bomba) un diferencial de presión. En un paso final, la solución se filtra a través de la torta de DE formada y el filtro de soporte y se transfiere a una unidad corriente abajo para su posterior procesamiento. El mismo diferencial de presión u otro mueve la solución a través de la capa y el filtro de soporte y hacia afuera. La integración del filtro de soporte en el biorreactor permite un diseño optimizado que minimiza el espacio requerido necesario para su instalación y funcionamiento.

El uso de DE como filtro de torta permite además la reducción del área superficial necesaria. Por ejemplo, un máximo de 250 cm² por cada 1L de la cosecha de cultivos celulares floculados será suficiente para proporcionar una clarificación efectiva de cultivos celulares. Alternativamente, se puede utilizar un máximo de 200 cm² para cada 1L. Incluso más de 150 cm², 100 cm² o 50 cm² pueden ser suficientes por cada 1L de la cosecha de cultivos celulares floculados.

El material polimérico de la carcasa podría ser tereftalato de polietileno y el filtro de soporte puede estar hecho de polietileno que tenga una porosidad dependiendo del grado de DE usado que podría variar de 0,1 micrómetros a 50 micrómetros, o de 0,7 micrómetros a 30 micrómetros, o de 7 a 12 micrómetros. El filtro de soporte puede ser una membrana o soporte poroso o de malla simple. Sin embargo, con el fin de evitar el flujo de los flóculos a través de la superficie del filtro de soporte antes de que la torta de DE se forme sobre la misma, el filtro de soporte puede ser un filtro real de características apropiadas basadas en el cultivo celular. Los ejemplos son una membrana de polietileno, un filtro de profundidad de celulosa o una membrana de polietileno.

Después de terminar la etapa de filtración, la estructura de DE o la torta de DE puede lavarse con un tampón apropiado para recuperar la biomolécula de interés retenida en la torta de filtro y luego se puede desechar. Preferiblemente, el tampón de lavado es isotónico para la cosecha de cultivos celulares en términos de pH y conductividad. Una persona experta en la técnica puede seleccionar fácilmente un tampón isotónico apropiado para la cosecha de cultivos celulares que se somete a clarificación. Por ejemplo, de preferencia, un tampón de lavado utilizado para recoger la cosecha clarificada a pH 5,3 tiene la siguiente composición: acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 125 mM, pH 5.30. Si la cosecha se clarifica en condiciones neutras, entonces un

tampón de eliminación de preferencia tiene la siguiente composición: fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 125 mM, pH 7.0. Esta es una distinción de los métodos de clarificación que involucran la precipitación y sedimentación del material no-diana y moléculas y extracción del sobrenadante obtenido.

En otra realización, un segundo recipiente de filtración está comprendido en el sistema, corriente abajo del recipiente de filtración o cuerpo y corriente arriba de la unidad de purificación. El segundo recipiente de filtración puede ser similar a, o diferente del primer recipiente de filtración. Por ejemplo, opcionalmente, se coloca un filtro de profundidad corriente abajo del recipiente de filtro. El filtro de profundidad se elige de manera que las biomoléculas objetivo lo atraviesen mientras retienen la mayor cantidad posible de otros contaminantes eventuales. Esto reduce aún más la presencia de contaminantes en el cultivo celular clarificado y mejora aún más la claridad del filtrado obtenido en caso de que se requiera para una aplicación adicional, como purificación con una unidad de purificación. En ciertas realizaciones, el recipiente de filtración es un recipiente de microfiltración para controlar la biocarga.

El cultivo celular clarificado podría acondicionarse adicionalmente y/o procesarse para obtener biomoléculas purificadas. En el sistema se puede usar una unidad de purificación corriente abajo para purificar biomoléculas de interés a partir de dicho cultivo celular. El pH y/o la conductividad del cultivo celular clarificado se podrían ajustar para tratamientos adicionales. La cosecha de cultivos celulares clarificados puede:

- pasarse a través de un filtro funcionalizado adicional,
- concentrarse e intercambiarse el tampón por ultrafiltración y diafiltración,
- procesarse mediante filtración de flujo tangencial de alto rendimiento,
- precipitarse del cultivo celular clarificado por polietilenglicol,
- precipitarse selectivamente del cultivo celular clarificado por una sal cosmotrópica tal como sulfato de amonio, sulfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio o citrato de potasio,
- procesarse mediante una cromatografía tal como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de exclusión estérica, cromatografía de exclusión preferencial, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxiapatita, o la denominada cromatografía en modo mixto, en la que un medio de cromatografía dado comprende múltiples funcionalidades químicas capaces de

lograr diferentes resultados de fraccionamiento que las funcionalidades constituyentes, aplicadas secuencialmente, o cualquier combinación de los tratamientos antes mencionados.

En un tercer aspecto, un kit facilita la práctica de cualquiera de las realizaciones del método como se describe anteriormente para clarificación de cultivos celulares que comprende uno o más compuestos elegidos del grupo de ácidos grasos que tienen de 7 a 10 átomos de carbono y derivados de los mismos, ureidos y compuestos electropositivos; tierra de diatomeas y un folleto con instrucciones para el usuario. En una realización, el kit comprende uno o más ácidos grasos que tienen de 7 a 10 átomos de carbono o derivados de los mismos, alantoína y uno o más compuestos electropositivos. El ácido graso se selecciona del grupo que comprende ácido enántico (heptanoico), ácido caprílico (octanoico), ácido pelargónico (nonanoico), o ácido cáprico (decanoico) o cualquier combinación de los mismos. En una realización adicional, el ácido graso y/o la alantoína y/o el compuesto electropositivo y/o la tierra de diatomeas están en forma sólida, más preferiblemente en forma de polvo.

En una realización adicional, el kit comprende un sistema como se describe anteriormente para clarificar un cultivo celular y purificar biomoléculas de interés.

Descripción detallada de las figuras

Las figuras 1A a 1C: muestran vistas esquemáticas de posibles configuraciones para llevar a cabo métodos para clarificación de cultivos celulares de acuerdo con las realizaciones de la descripción.

De acuerdo con una realización del método para la clarificación de cultivos celulares, uno o más compuestos que alteran las propiedades físicas del cultivo celular permiten la formación de flóculos (1) de solutos y/o precipitados se añaden al cultivo celular. Estos compuestos se pueden añadir, de acuerdo con una realización de la descripción, directamente al biorreactor (2) en el cual se lleva a cabo la producción de cultivos celulares y en donde reside el cultivo celular que comprende moléculas de interés (configuración como se muestra en la figura 1A). De acuerdo con una realización alternativa, el cultivo celular se transfiere primero desde el biorreactor (2) a un recipiente intermedio (3) y los compuestos mencionados anteriormente se añaden al cultivo celular que reside en ese recipiente intermedio (3) (configuración como se muestra en la figura 1B). Este diseño particular podría ser ventajoso en caso de que el biorreactor sea un biorreactor de alta densidad celular con un lecho celular fijo, que es

menos adecuado para acomodar la adición de los compuestos y/o la DE. El uso de un recipiente intermedio (3) puede ser ventajoso cuando la formación de flóculos (1) pudiese, por ejemplo, dañar el biorreactor o impedir su funcionamiento, o cuando no es posible la agitación adecuada del cultivo celular con los compuestos de floculación añadidos en el biorreactor en el que se produce la producción de cultivos celulares. Se añade tierra de diatomeas (4) al cultivo celular también, ya sea directamente al cultivo celular que reside en el biorreactor (2) (configuración como se muestra en la Figura 1A) o al cultivo celular que reside en el recipiente intermedio (3) (configuración como se muestra en la Figura 1B). En un siguiente paso, que es idéntico para ambas realizaciones, la solución que contiene flóculos (1) de solutos y/o precipitados se transfiere a un recipiente de filtración (5) que comprende un filtro de soporte (6, visto de cerca en la Figura 1A) que es impermeable a la tierra de diatomeas (4). Las figuras 1A y 1B muestran la formación de una capa de torta (7) de tierra de diatomeas (4) sobre la superficie (6a), filtrando así la solución a través de la torta (7) y el filtro de soporte (6). Las flechas ilustran el flujo del cultivo celular clarificado a través de la superficie (6a) en las Figuras 1A y 1B. La ubicación de la superficie viene dictada por la dirección de presión diferencial para la transmisión de fluido. El recipiente de filtración 5 puede ser un recipiente rígido o una bolsa de un solo uso con soporte, con o sin un mezclador conocido en la técnica de agitación.

En una realización alternativa, que se muestra en la Figura 1C, se proporciona un sistema integrado en el que un filtro de soporte está presente en un biorreactor (2), preferiblemente en la parte inferior del biorreactor cerca a o en una salida (12). En esta configuración, el cultivo celular se desarrolla en el biorreactor. En un paso posterior, se añaden los compuestos y DE - ya sea secuencial o simultáneamente - directamente en el biorreactor mientras se agita (ya sea mediante mezcla o balanceo) después de lo cual la capa de DE (7) se forma sobre la superficie (6a) presente en el biorreactor y la cual permite el filtrado a través del filtro (6) y la capa (7). La salida filtrada puede transferirse posteriormente a una unidad de (micro) filtro y purificación, por ejemplo, una columna de cromatografía. Para este propósito, el biorreactor puede estar en conexión fluida con dicho (micro) filtro o unidad de purificación. En una realización, se puede colocar un recipiente intermedio (no se muestra) entre el biorreactor y el filtro corriente abajo o unidad de purificación, para recolectar temporalmente la cosecha clarificada que proviene del biorreactor. Un mecanismo impulsor de fluido tal como una bomba puede asegurar la transferencia de la cosecha clarificada de una unidad a otra.

La figura 2A muestra una vista general esquemática de un sistema para clarificar un cultivo celular y purificar biomoléculas de interés, de acuerdo con una realización de la descripción.

El sistema de clarificación de un cultivo celular y purificación de biomoléculas de interés representado en la Figura 2A consiste en un recipiente (8) para recibir, producir o almacenar temporalmente un cultivo celular, tal como un biorreactor o un recipiente intermedio, opcionalmente provisto de un mezclador (15) que se conecta fluidamente a un recipiente de filtración (5). La superficie (6a) presente en el recipiente de filtración (5) es impermeable a la tierra de diatomeas, permitiendo así la formación de una capa o torta de tierra de diatomeas sobre la superficie (6a). El sistema comprende además una bomba (9) para transferir el cultivo celular desde el recipiente (8) al recipiente de filtración (5) y sensores de presión (10) situados en la entrada (11) y salida (12) del recipiente de filtración (5). Finalmente, una unidad de purificación (13) que está situada corriente abajo del recipiente de filtración (5) permite la purificación de biomoléculas de interés del cultivo celular.

La Figura 2B muestra una vista general esquemática de un sistema para clarificar un cultivo celular y purificar biomoléculas de interés, de acuerdo con las realizaciones de la descripción:

Purificación de anticuerpos monoclonales IgG1

Un litro de cosecha de cultivo celular CHO fresco sin clarificar con una densidad celular viable de $7.2 \cdot 10^6$ células/ml y una viabilidad del 90% se mantuvo a agitación constante en un recipiente (8) para recibir un cultivo celular (tal como un recipiente intermedio, 3) corriente abajo de un biorreactor (2) produciendo dicho cultivo). Las células cultivadas expresaron anticuerpo monoclonal de IgG1 con un título de aproximadamente 0,5 g/L. Se retiraron tres muestras de cosecha de 15 ml para determinar el peso de las células húmedas (WCW) que fue de 38 g/L. la turbidez inicial de la cosecha se midió con un turbidímetro calibrado y fue de 1150 NTU.

Los siguientes compuestos se añadieron al cultivo de células CHO sin clarificar en el recipiente (8):

- 1% p/v de Alantoína (10 g por 1 litro de cosecha),
- 0,45% v/v de ácido octanoico (4,5 ml por 1 litro de cosecha), y
- 0,08% p/v de quitosano de alto peso molecular (0,8 g por 1 litro de cosecha) con un peso molecular medio en el rango de 300 kDa a 400 kDa.

El pH de la solución se ajustó a 5,30 utilizando ácido acético 1M. La solución se agitó a 120 rpm a temperatura ambiente sin dejar sedimentar los precipitados y/o floculantes formados (1). Después de 45 minutos de agitación constante, se añadieron 15,2 g de tierra de diatomeas (DE, 4) de grado Celpure 300® a 1L de solución (40% del WCW que se determinó experimentalmente antes de la adición de los compuestos). La solución formada se agitó durante 5 minutos adicionales. La solución se sometió a un procesamiento adicional como se describe a continuación.

Posteriormente, el recipiente (8) que contenía la solución se conectó a un recipiente de filtración (5) que estaba hecho de carcasa de tereftalato de polietileno y superficie de la membrana de polietileno (6) con una distribución de poros entre 7 μm y 12 μm con un área de superficie total de 21 cm^2 . La carcasa era impermeable a la tierra de diatomeas (4) de partículas Celpure 300® y otro material particulado grande. La solución se mantuvo bajo agitación constante y se introdujo en el recipiente de filtración (5) con una bomba peristáltica (9) a un caudal constante de 18 ml/min. Un sensor de presión (10) se instaló en la entrada (11) del recipiente de filtración (5) y se calculó el caudal utilizando una lectura de balanzas calibradas. La solución se filtró con el recipiente de filtración (5) en 48 minutos, lo que corresponde a un flujo medio de 511,9 LMH (litros por metro cuadrado por hora). La presión medida en la entrada (11) del recipiente de filtración (5) aumentó de una manera lineal hasta 0,68 bares para al final de la filtración. La capacidad de filtración final lograda fue de 409,5 l/m^2 , y la turbidez del filtrado se redujo de 1150 NTU a 17 NTU (este es un valor de la turbidez del pool; se observó una disminución de la turbidez del filtrado a través de la duración de la filtración). Cuando se finalizó la filtración, la torta o estructura de DE (7) se enjuagó con 70 ml de solución que contenía tampón de acetato de sodio 50 mM, cloruro sodio 125 mM y tenía PH 5.30. Esto se realizó para recoger el producto que se retiene dentro de la torta del filtro DE (7) y mejorar la recuperación de la molécula diana. La turbidez del pool disminuyó hasta 14,8 NTU después de la retirada del producto con tampón auxiliar.

La cosecha clarificada puede procesarse opcionalmente con un segundo recipiente de filtración adicional (14): un filtro de profundidad disponible comercialmente (Sartoclear P Caps DL20). La cosecha clarificada se filtró en 100 minutos con un flujo total de 206,4 LMH, una capacidad de al menos 344 l/m^2 y a una baja presión constante de 0,21 bares. La turbidez se redujo a 1,8 NTU. El filtro de profundidad se recogió con el mismo tampón que el utilizado para la torta de filtro DE (7) para recuperar el producto

objetivo. El pH de la cosecha clarificada se ajustó a 7,0 con una base TRIS 2M pH 9,5 y se filtró con un filtro de 0,22 μm antes del procesamiento adicional.

La molécula diana se capturó a partir de la cosecha clarificada en la unidad de purificación (13) utilizando tres resinas de afinidad diferentes (CaptivA PriMab por Platigen, MabCapture A Select por Thermofischer Scientific y Amsphere A3 por JSR). El desempeño del método de clarificación de acuerdo con una realización de la descripción se evaluó midiendo el contenido de proteínas de la célula huésped CHO (HCP) en eluidos de resinas de afinidad usando el kit genérico CHO ELISA disponible de Cygnus Technologies. El contenido de HCP en todos los eluidos fue consistente y estuvo entre 30 y 35 ppm.

Purificación de anticuerpos monoclonales IgG4

Un litro de cosecha de cultivo celular CHO fresco sin clarificar con una densidad celular viable de 3.2×10^6 células/ml y una viabilidad del 81% se mantuvo en agitación constante en un recipiente (8) para producir un cultivo celular tal como biorreactor (2). Las células cultivadas expresaron anticuerpo monoclonal IgG4 con un título de 0,4 g/l y punto isoeléctrico teórico de 5.71. El WCW Fue de 34 g/l. La turbidez inicial de la cosecha fue de 528 NTU.

Los siguientes compuestos se añadieron al cultivo de células CHO sin clarificar en el recipiente (8):

- 1% p/v de Alantoína (10 g por 1 litro de cosecha),
- -0,45% v/v de ácido octanoico (4,5 ml por 1 litro de cosecha), y
- 0.075% v/v de poli (cloruro de dialildimetil-amonio) (pDADMAC 0.075 mL por 1 litro de cosecha) con un peso molecular promedio en el rango de 200 kDa a 350 kDa.

El pH de la solución se ajustó a $5,60 \pm 0,1$ utilizando ácido acético 1M y la conductividad se mantuvo sin alterar a 12 ± 1 mS/cm. La solución se agitó a 150 rpm a temperatura ambiente sin dejar sedimentar los precipitados y/o floculantes formados (1). Después de 45 minutos de agitación constante, 13 g de tierra de diatomeas (DE, 4) de grado Celpure 300© se agregaron a 1L de solución (aproximadamente 40% del WCW). La solución formada se agitó durante 15 minutos adicionales.

El recipiente (8) que contenía la solución se conectó a un recipiente de filtración de un solo uso (5) que se hizo de una carcasa de poliamida de la Clase VI USP y su

membrana de filtro de profundidad de celulosa, un auxiliar de filtración natural y un agente de resistencia catiónico, formaron una superficie (6) con una distribución de poro entre 10 μm y 30 μm con un área superficial total de 20 cm^2 . La superficie (6) era impermeable a la tierra de diatomeas (4) de partículas Celpure 300® y otro material particulado grande. La solución se mantuvo bajo agitación constante y se introdujo en el recipiente de filtración (5) con una bomba peristáltica (9) a un caudal constante de 350 LMH. Se instaló un sensor de presión (10) en la entrada del recipiente de filtración y se monitorizó el flujo mediante la lectura de una balanza calibrada. La presión medida en la entrada de los medios de filtración aumentó de manera lineal hasta 0,5 bares al final de la filtración. La capacidad de filtración final lograda fue de 575,5 l/m², y luego el procesamiento se detuvo ya que toda la cosecha de cultivo celular se clarificó sin alcanzar los límites de presión del recipiente de filtración (5).

Una vez finalizada la filtración, la torta formada (7) se enjuagó con 3 volúmenes retenidos de tampón de equilibrio tampón de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 120 mM, pH 5,60. La turbidez del depósito de cosecha clarificado fue de 1,2 NTU. El pH de la cosecha clarificada se ajustó a 7,0 con una base TRIS 2M pH 9,5, y luego se procesó con un segundo recipiente de filtración de grado esterilizante (14) hecha de polietersulfona (PES) con un tamaño de poro de 0,5/0,2 μm . El tamaño del filtro se basó en la prueba V_{max} realizada a una presión constante de 1 bar y el volumen de producción alcanzado fue de más de 2.500 l/m².

La molécula diana se capturó de la cosecha clarificada usando una unidad de purificación (13) que comprende una resina de cromatografía de afinidad Mabselect Sure LX con 4 minutos de tiempo de residencia. El contenido de proteínas de la célula huésped CHO (HCP) en el eluato de la columna de captura se midió usando el kit genérico CHO ELISA de Cygnus Technologies y fue de 42 ppm.

Purificación de anticuerpos monoclonales IgG1

0,5L de cosecha de cultivo celular CHO fresco sin clarificar con una densidad celular viable de 3.3×10^6 células/ml y una viabilidad del 91% se mantuvo en agitación constante en un recipiente (8) para almacenar temporalmente un cultivo celular (tal como un recipiente intermedio, 3) corriente abajo de un biorreactor (2) produciendo dicho cultivo. Las células cultivadas expresaron anticuerpo monoclonal

IgG1 con un título de 0,44 g/L y punto isoeléctrico teórico de 8,61. El WCW se determinó como se describe anteriormente y fue 14,5 g/i.

Los siguientes compuestos se añadieron al cultivo de células CHO sin clarificar en el recipiente (8):

- 1% p/v de Alantoína (10 g por 1 litro de cosecha),
- 0,45% v/v de ácido octanoico (4,5 ml por 1 litro de cosecha), y
- 0.075% v/v de poli (cloruro de dialildimetil-amonio) (pDADMAC 0.075 g por 1 litro de cosecha) con un peso molecular promedio en el rango de 200 kDa a 350 kDa.

El pH de la solución se ajustó a $5,30 \pm 0,1$ utilizando ácido acético 1M y la conductividad se mantuvo sin alterar a 12 ± 1 mS/cm. La solución se agitó a 150 rpm a temperatura ambiente sin dejar sedimentar los precipitados y/o floculantes formados (1). Después de 30 minutos de agitación constante, 10 g/L de tierra de diatomeas (DE, 4) de grado Celpure 300® se agregaron a la solución, la cual se agitó durante 15 minutos adicionales.

El recipiente (8) que contenía la solución se conectó a un recipiente de filtración de un solo uso (5) con una carcasa hecha de poliamida de la Clase VI USP y una membrana de filtro de profundidad de celulosa, un auxiliar de filtración natural y un agente de resistencia catiónico, que formaron una superficie (6) con una distribución de poro entre 10 μm y 30 μm con un área superficial total de 20 cm^2 . La superficie (6) era impermeable a la tierra de diatomeas (4, DE) de partículas Celpure 300® y otro material particulado grande.

La solución se mantuvo bajo agitación constante y se introdujo en el recipiente de filtración (5) con una bomba peristáltica (9) a un caudal constante de 400 LMH. Se instaló un sensor de presión (10) en la entrada (11) del recipiente de filtración (5) y se monitorizó el flujo mediante la lectura de una balanza calibrada. La presión medida en la entrada (11) del recipiente de filtración (5) aumentó de manera lineal hasta 0,6 bares al final de la filtración. La capacidad de filtración final lograda fue de 550 l/m², y luego el procesamiento se detuvo ya que toda la cosecha de cultivo celular se clarificó sin alcanzar los límites de presión del recipiente de filtración (5).

Una vez finalizada la filtración, la torta formada (7) se enjuagó con 3 volúmenes retenidos de tampón de equilibrio tampón de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 120 mM, pH 5,30 para recoger el producto que se retiene dentro de la torta de

filtración (7) y mejorar la recuperación. La turbidez del pool de cosecha clarificado fue de 1,4 NTU después del procesamiento.

El pH de la cosecha clarificada se ajustó a 7,0 con una base TRIS 2M pH 9,5, y luego la cosecha clarificada se filtró con un segundo recipiente de filtración (14) que consiste de un recipiente de microfiltración elaborado en poliétersulfona (PES) con un tamaño de poro de 0,5/0,2 μm . El tamaño del filtro se basó en la prueba V_{max} Realizada a una presión constante de 1 bar y el volumen de producción obtenido fue de más de 2.300 l/m².

La molécula diana (anticuerpo monoclonal IgG1) se capturó de la cosecha clarificada en la unidad de purificación (13) utilizando una resina de cromatografía de afinidad Mabselect Sure LX con 4 minutos de tiempo de residencia. El contenido de proteínas de la célula huésped CHO (HCP) en el eluato de la columna de captura se midió usando el kit genérico CHO ELISA de Cygnus Technologies y fue de 40 ppm.

Purificación de anticuerpos monoclonales IgG1

0,5 litros de cosecha de cultivo celular CHO fresco sin clarificar con una densidad celular viable de 5.55×10^6 células/ml y una viabilidad del 88% se mantuvo en agitación constante en un recipiente (8) para recibir un cultivo celular (tal como un recipiente intermedio, 3) corriente abajo de un biorreactor (2) produciendo dicho cultivo. Las células cultivadas expresaron anticuerpo monoclonal IgG1 con un título de 0,3 g/l y punto isoeléctrico teórico de 8,46.

Los siguientes compuestos se añadieron al cultivo de células CHO sin clarificar en el recipiente (8):

- 1% p/v de Alantoína (10 g por 1 litro de cosecha),
- 0,45% v/v de ácido octanoico (4,5 ml por 1 litro de cosecha), y
- 0.075% v/v de poli (cloruro de dialildimetil-amonio) (pDADMAC 0.075 g por 1 litro de cosecha) con un peso molecular promedio en el rango de 200 kDa a 350 kDa.

El pH de la solución se ajustó a $5,30 \pm 0,1$ utilizando ácido acético 1M y la conductividad se mantuvo sin alterar a 12 ± 1 mS/cm. La solución se agitó a 200 rpm a temperatura ambiente sin dejar sedimentar los precipitados y/o floculantes formados

(1). Después de 30 minutos de agitación constante, tierra de diatomeas (DE, 4) de grado Celpure 300® se agregaron a la solución para tener una concentración final de DE igual a 15 g/l. La solución formada se agitó durante 15 minutos adicionales.

El recipiente (8) que contenía la solución se conectó a un recipiente de filtración (5) con una carcasa hecha de poliamida de la Clase VI USP y una membrana de filtro de profundidad de celulosa, un auxiliar de filtración natural y un agente de resistencia catiónico, que formaron una superficie (6) con una distribución de poro entre 10 μm y 30 μm con un área superficial total de 20 cm^2 . La superficie (6) era impermeable a la tierra de diatomeas (4) de partículas Celpure 300® y otro material particulado grande.

La solución se mantuvo bajo agitación constante y se introdujo en el recipiente de filtración (5) con una bomba peristáltica (9) a un caudal constante de 400 LMH. Se instaló un sensor de presión (10) en la entrada (11) del recipiente de filtración (5) y se monitorizó el flujo mediante la lectura de una balanza calibrada. La presión medida en la entrada (11) del recipiente de filtración (5) aumentó de manera lineal hasta 0,35 bares al final de la filtración. La capacidad de filtración final lograda fue de 348.5 l/m², y luego el procesamiento se detuvo ya que toda la cosecha de cultivo celular se clarificó sin alcanzar los límites de presión del recipiente de filtración (5).

Una vez finalizada la filtración, la torta de DE formada (7) se enjuagó con 3 volúmenes retenidos de tampón de equilibrio tampón de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 120 mM, pH 5,30 para recoger el producto que se retiene dentro de la torta de filtro (7) y mejorar la recuperación. La turbidez del pool de cosecha clarificado fue de 1,4 NTU.

El pH de la cosecha clarificada se ajustó a 7,0 con una base TRIS 2M pH 9,5, y luego la cosecha clarificada se filtró con un segundo recipiente de filtración (14) que consiste de un recipiente de microfiltración hecho de poliétersulfona (PES) con un tamaño de poro de 0,5/0,2 μm . El tamaño del filtro se basó en la prueba V_{max} realizada a una presión constante de 1 bar y el rendimiento obtenido fue de más de 772 l/m².

La molécula diana (anticuerpo monoclonal IgG1) se capturó de la cosecha clarificada en la unidad de purificación (13) que consiste de una columna de afinidad preenvasada Eshmuno A de Merck con 4 minutos de tiempo de residencia. El contenido de proteínas de la célula huésped CHO (HCP) en el eluato de la columna de captura se midió usando el kit genérico CHO ELISA de Cygnus Technologies y fue de 53 ppm.

Purificación de anticuerpos monoclonales IgG1

7,7 L de cultivo celular CHO fresco sin clarificar la cosecha con una densidad celular viable de 3.3×10^6 células/ml y una viabilidad del 91% se mantuvo en agitación constante en un recipiente (8) para recibir un cultivo celular (tal como un recipiente intermedio, 3) corriente abajo de un biorreactor (2) produciendo dicho cultivo. Las células cultivadas expresaron anticuerpo monoclonal IgG1 con un título de aproximadamente 0,44 g/l y punto isoeléctrico teórico de 8,61. El WCW se determinó como se describe anteriormente y fue 14,5 g/L.

El siguiente tratamiento se le aplicó al cultivo celular no clarificado:

- 1% p/v de Alantoína (10 g por 1 litro de cosecha),
- 0,45% v/v de ácido octanoico (4,5 ml por 1 litro de cosecha), y
- 0.075% v/v de poli (cloruro de dialildimetil-amonio) (pDADMAC 0.075 g por 1 litro de cosecha) con un peso molecular promedio en el rango de 200 kDa a 350 kDa.

El pH de la solución se ajustó a 5,30 utilizando ácido acético 1M y la conductividad se mantuvo sin alterar a 12 ± 1 mS/cm. La solución se agitó a 150 rpm a temperatura ambiente sin dejar sedimentar los precipitados y/o flóculos formados (1). Después de 30 minutos de agitación constante, 10 g/L de tierra de diatomeas (DE, 4) de grado Celpure 300© se le agregaron a la solución y la solución se agitó durante 15 minutos adicionales. La solución se sometió entonces a procesamiento adicional como se describe a continuación.

El recipiente (8) que contenía la solución se conectó a un recipiente de filtración (5) con una carcasa externa hecha de polisulfona PSU / acero inoxidable y una superficie (6) definida por una membrana de filtro con un tamaño de poro de $0,7 \mu\text{m}$ y un área de superficie total de 120 cm². La superficie (6) era impermeable a la tierra de diatomeas (4) de partículas Celpure 300© y otro material particulado grande.

La solución se mantuvo bajo agitación constante y se introdujo en el recipiente de filtración (5) mediante una bomba centrífuga de un solo uso (9) con un caudal de hasta 1800 LMH en tres ciclos separados de volumen equivalente. Se instalaron sensores de presión (10) en la entrada (11) y la salida (12) del recipiente de filtración (5) para medir la presión diferencial. El flujo fue monitoreado por un medidor de flujo en línea. La presión medida en la entrada (11) del recipiente de filtración (5) aumentó de una manera lineal hasta 0,65 bares al final de la filtración. Se logró un rendimiento

de 642 l/m² y luego se detuvo el procesamiento ya que toda la cosecha de cultivos celulares se clarificó sin alcanzar los límites de presión del recipiente de filtración (5).

La torta de DE (7) se enjuagó con 400 ml de tampón de equilibrio 50 mM de tampón de acetato de sodio, 120 mM de cloruro de sodio y tenía pH 5,30 para recoger el producto que se retiene dentro de la torta de filtración (7) y mejorar la recuperación. La turbidez del depósito de cosecha clarificado 3 NTU.

El pH de la cosecha clarificada se ajustó a 7,0 con TRIS-HCl 2M pH 9,5 y luego se procesó con un segundo recipiente de filtración (14) que comprende un filtro de calidad esterilizante hecho de polietersulfona (PES) con un tamaño de poro de 0,2 µm.

La molécula objetivo (anticuerpo monoclonal IgG1) se capturó de la cosecha clarificada usando una unidad de purificación (13) que comprende medio de cromatografía de afinidad MAbSelect PrismA con un tiempo de residencia de 4 minutos. El desempeño de la clarificación usando el método de acuerdo con una realización de la descripción se evaluó midiendo el contenido de proteínas de células huésped CHO (HCP) en eluato de resina de afinidad usando el kit genérico CHO ELISA disponible de Cygnus Technologies. El contenido de proteínas de la célula huésped CHO (HCP) en el eluato de la columna de captura se midió utilizando el kit genérico CHO ELISA de Cygnus Technologies y fue de 72 ppm.

1. Flóculos
2. Biorreactor
3. Recipiente intermedio
4. Tierra de Diatomeas
5. Recipiente de filtración
6. Superficie
7. Capa o torta de tierra de diatomeas
8. Recipiente
9. Bomba
10. Sensor de presión
11. Entrada
12. Salida

- 13. Unidad de purificación
- 14. Segundo recipiente de filtración
- 15. Mezclador

Se supone que la descripción no se limita a ninguna forma de realización descrita anteriormente y que se pueden agregar algunas modificaciones al ejemplo presentado sin una nueva evaluación de las reivindicaciones adjuntas.